

I. Baci

HOMEOSTAZIA OXIGENULUI

I. BACIU

HOMEOSTAZIA OXIGENULUI

**EDITURA DACIA CLUJ-NAPOCA
1980**



P R E F A Ț A

În monografia de față, autorul și-a propus să prezinte într-o vedere sintetică datele mai importante asupra homeostaziei oxigenului din domeniul biologiei și medicinei experimentale și clinice, între care și rezultatele cercetărilor pe care le-a efectuat în ultimii 20 ani împreună cu colectivele de fiziologie pe care le conduce (Prof. M. Dorofteiu, Prof. L. Grosu, Conf. E. Rosenfeld, Dr. doc. P. Derevenco, Dr. V. Al. Vasile, Dr. Vanda Vitebski, Dr. Liana Ivanof, Dr. N. Stoica, Dr. A. Olteanu, Dr. T. Pavel, N. Vlasie, și alții), care au fost discutate la numeroase manifestări științifice și internaționale și publicate în periodice de specialitate. Utilă a fost în munca grupului nostru prețioasa colaborare cu Prof. St. Secăreanu în purificarea cromatografică a eritropoetinei, cu Prof. C. Opreșiu în studiul rolului rinichiului în eritropoeză, cu Prof. Dr. L. Tomuș, Conf. Dr. L. Gozariu, Dr. doc. P. Pitea precum și Dr. E. Neumann, fizician V. Șoltuz și Dr. D. Poruțiu în probleme tangente cu domeniile de specialitate pe care le reprezintă. Se propune, în colaborare cu conf. Dr. O. Aramă, un model matematic al homeostaziei oxigenului.

Scopul lucrării este de a reda în concept funcțional, de a analiza critic și de a ierarhiza mecanismele fiziologice de reglare care — în cadrul unui sistem unitar complex — mențin în lichidul interstițial concentrația constantă a O_2 , între anumite limite, optime, pentru asigurarea continuă și neperтурbată a proceselor respiratorii celulare. În acest sens, se expune rolul respirației pulmonare precum și cel al sîngelui în

aportul și în transportul de oxigen. Se analizează cu deosebită re, rolul și adaptarea prin mecanisme nervoase și umorale, a eritronului în homeostazia oxigenului. Se acordă atenție studiului factorilor de care depinde P_{O_2} tisular, între care debitul circulator și schimburile prin pereții capilarelor sanguine. Sînt analizați factorii perturbanți, care declanșează intervenția mecanismelor nervoase, endocrine și umorale în restabilirea homeostaziei oxigenului.

Sînt dezvoltate cu deosebire domeniile relativ la homeostazia oxigenului, în care grupul nostru a efectuat cercetări și a obținut rezultate originale: mecanisme și semnificația răspunsului eritrocitar la hipoxie.

Pe lângă analiza unor aspecte de specializare avansată, ce pot interesa pe fiziologi, biochimiști, hematologi, specialiști în domeniul clinicii respirației, circulației și în cel al sportului, prezentarea sintetică și analiza critică a principalelor date funcționale actuale asupra homeostaziei oxigenului este de interes pentru toți medicii și biologii, preocupați de cunoașterea domeniului analizat, azi în plină dezvoltare.

Bibliografia completă a lucrării ar fi reclamat un spațiu mult prea extins. De aceea, ea cuprinde numai o parte din lucrările citate în text. Restul pot fi găsite în bibliografiile unor excelente monografii sau în culegeri de articole apărute în ultimii ani, precum și în publicațiile noastre.

Mulțumesc Editurii Dacia pentru condițiile excelente în care lucrarea vede lumina tiparului, precum și colaboratorilor care mi-au acordat un prețios sprijin în pregătirea materialului.

Autorul

CUPRINS

PREFAȚA	5
CAP. I. HOMEOSTAZIA ȘI ADAPTAREA FUNCȚIONALĂ	9
Homeostazia	9
Adaptarea fiziologică	14
Homeostazia oxigenului	16
CAP. II. REGLAREA RESPIRAȚIEI ȘI CIRCULAȚIEI ÎN HOMEOSTAZIA OXIGENULUI	19
Chemoreceptorii	19
Chemoreceptorii periferici	20
Chemoreceptorii centrali	23
Rolul zonelor chemoceptive în reglarea respirației	25
CAP. III. RESPIRAȚIA PULMONARĂ ȘI HOMEOSTAZIA OXIGENULUI	26
Rezistențele respiratorii	26
Schimbul alveolar de gaze	30
CAP. IV. TRANSPORTUL ȘI CEDAREA OXIGENULUI DE CĂTRE SÎNGE	36
Debitul arterial de oxigen	37
Debitul cardiac	37
Cedarea oxigenului în țesuturi. Cianoza	40
CAP. V. FIXAREA OXIGENULUI PE HEMOGLOBINĂ	43
Hemoglobina	43
Curba de disociere a oxihemoglobinei	46
Efectele pH, ale P_{CO_2} , ale temperaturii și ale 2—3 DPG asupra conformației moleculare a Hb și a CDO	47
CAP. VI. FIXAREA CO_2 PE SÎNGE. SISTEME TAMPON	52
CAP. VII. TENSIUNEA OXIGENULUI ÎN ȚESUTURI ȘI RESPIRAȚIA CELULARĂ	58
Tensiunea oxigenului	58
Respirația celulară	61
CAP. VIII. ȘOCUL CIRCULATOR	63
Mecanisme de producere	63
Șocul neprogresiv sau compensat	66
Șocul progresiv	66
Rezervele de oxigen ale organismului	67
Substituenții de sînge cu rol de fixare și transport al O_2	67

CAP. IX. ERITRONUL ȘI ERITROPOETINA	69
CAP. X. OBTINEREA ȘI TESTAREA ERITROPOETINEI	74
Obținerea eritropoetinei	74
Tehnici uzuale de testare	75
Testarea eritropoetinei <i>in vivo</i> prin incorporarea ⁵⁹ Fe	81
Testarea eritropoetinei <i>in vitro</i>	83
Unitatea de eritropoetină	87
CAP. XI. PURIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA ERITROPOETINEI	89
Purificarea eritropoetinei	89
Caracteristici fizico-chimice ale eritropoetinei	96
Caracteristici antigenice ale eritropoetinei	100
Testarea imunologică <i>in vivo</i>	101
Testarea imunologică <i>in vitro</i>	104
Neutralizarea activității biologice a eritropoetinei cu antiser imun	109
CAP. XII. LOCUL DE PRODUCERE ȘI MECANISMUL DE FORMARE A ERITROPOETINEI	110
Rolul rinichiului	110
Sistemul reticulo-endotelial și producerea eritropoetinei	116
Mecanismul renal de formare	121
Formarea extrarenală	122
Originea subcelulară a profactorului eritropoetic	128
CAP. XIII. EFECTE BIOLOGICE ALE ERITROPOETINEI	133
Efectul radioprotector al eritropoetinei	134
Efectul eritropoetinei asupra celulelor medulare	136
Efectul eritropoetinei asupra acizilor nucleici medulari	141
Efectul eritropoetinei asupra absorbției de riboză	145
Efectul eritropoetinei asupra debitului circulator al măduvei osoase	154
Testarea funcției măduvei hematopoetice	156
CAP. XIV. FACTORUL INHIBITOR AL ERITROPOEZEI	163
CAP. XV. IMPLICAȚII CLINICE ALE ERITROPOETINEI	166
Creșterea producerii de eritropoetină	166
Scăderea eritropoetinei serice	170
Eritropoetina în terapie	171
CAP. XVI. REGLAREA NERVOASĂ A ERITROPOEZEI	174
Reglarea nervos centrală	175
Localizarea structurilor central nervoase de reglare	189
Rolul complexului epitalamo-epifizar în eritropoeză	196
Rolul simpaticului	197
Reglarea eritropoezei prin mecanism periferic	202
CAP. XVII. REGLAREA ERITROPOEZEI LA FĂT ȘI NOU-NĂSCUT	206
CAP. XVIII. MODEL MATEMATIC AL HOMEOSTAZIEI OXIGENULUI	211
Schema cibernetică integrativă	211
Parametrii sistemului	211
Interpretarea sistemului ca ansamblu de subsisteme	213
Ecuațiile sistemului homeostatic	216
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	217
REZUMAT ÎN LIMBA ENGLEZĂ	235

HOMEOSTAZIA ȘI ADAPTAREA FUNCȚIONALĂ

HOMEOSTAZIA

Noțiunea de homeostazie se leagă de numele fiziologului american Walter Bradford Cannon. El a introdus în fiziologie această noțiune în anul 1929. Conceptul a fost prelucrat de autor, dându-i o accepțiune ce părea deplin conturată pentru acesta în expunerea „The Window of the Body” în care Cannon (1939) delimitează această idee:

„Într-un sistem deschis, așa cum reprezintă organismul nostru, compus din substanță instabilă și supus continuu la condiții disturbante, este evident că o serie de factori acționează pentru menținerea acestei constanțe. În mod automat intră în joc factori care rezistă la schimbare.” În cadrul acestei explicații homeostazia reprezintă capacitatea organismelor superioare de a se menține cu caracteristicile lor morfologice și funcționale într-un mediu de viață variabil. În acest proces Cannon acordă o importanță mediului intern, matricei lichide a organismului, pe care o consideră ca reprezentând o forță de integrare, și sistemului simpato-adrenal, ca sistem principal reactiv față de schimbările cu caracter perturbant.

În conceptul de homeostazie, noțiunea de mediu intern „milieu intérieur”, cu caracteristici constante, care asigură condițiile de viață elementelor anatomice ale corpului, aparține lui Cl. Bernard (1865). În opera sa capitală *Introducere la studiul medicinei experimentale* Cl. Bernard scria: „În orice ființă vie mediul intern, care este un adevărat produs al organismului, menține raporturile necesare de schimb și echilibru cu mediul cosmic extern; dar pe măsură ce organismul evoluează, mediul organic se specializează și, într-un fel, se izolează din ce în ce mai mult de mediul înconjurător”. După Cl. Bernard (1850—1860), experimentarea în fiziologie e de neconceput fără a ține seamă de mediul intern. „Ar fi — scrie el în caietul roșu — ca și când am măsura condițiile aerului, pentru a face apoi experiențe pe peștii din apă” (apa

ar corespunde mediului intern, iar peștii elementelor tisulare aflate în acest mediu).

În altă parte, tot în caietul roșu, el subliniază importanța sistemului nervos, care „comunică cu lumea exterioară, și care dirijează funcționarea organelor interne pentru a constitui mediul lor intern în care trebuie să trăiască“.

Adept al concepției bernardiene, așa cum o declară el însuși, fiziologul român Daniel Danielopolu (1946) a sintetizat, în anul 1928, rezultatele cercetărilor pe care le-a întreprins în numeroase domenii ale medicinei, într-o schemă anatomo-fiziologică de funcționare a organismului, pe care a completat-o și amplificat-o prin lucrările ulterioare.

Față de concepțiile epocii, explicarea în ansamblu a mecanismelor de reglare a funcțiilor viscerele prin sistemul nervos organo-vegetativ, în concepția fiziologului român, reprezintă un progres întrucât Danielopolu include în schema de reglare scoarța cerebrală și hipotalamusul, față de care funcționarea sistemului vegetativ și endocrin sînt interpretate ca subordonate.

Un alt element nou în concepția sa este teoria echilibrului prin antagonismul interstimulant simpatic-parasimpatic.

În acest mod reglarea funcțiilor vegetative, se face pe verticală printr-un mecanism cortico-endocrino-efector, în care cele trei sisteme, nervos, endocrin și efector, se găsesc într-un echilibru dinamic, pe baza legilor propuse de Danielopolu: a interdependenței, legea predominanțelor, legea sinergismului și antagonismului și legea mecanismului circular.

Pe orizontală, menținerea echilibrului se realizează prin mecanismul antagonist interstimulant, supus legii amfomecanismului, legii predominanțelor și legii mecanismului circular. Mecanismul antagonist interstimulant este coordonat de mecanismul circular cortico-endocrino-efector.

În concepția lui Danielopolu, schema generală de funcționare a organismului, ... „boala poate lua naștere în orice punct al mecanismului circular cortico-endocrino-efector: în organul terminal, pe calea centripetă, pe centri, pe calea centrifugă nervoasă, pe calea centrifugă neuro-hormonală, iar nu numai în organul terminal, cum se crede în general în patologie, sau numai în glandele endocrine sau numai pe scoarța cerebrală“.

Ca expresie a dereglării mecanismului, cortico-endocrino-efector, care întreține în organul terminal modificării funcționale de intensitate, Danielopolu descrie „*cercul vicios reflex permanent*“ prin care explică sindroamele paroxistice (accesul anginos, astmatic, hipertensiunea).

Sub raport terapeutic, pe baza teoriei expuse construiește „farmacodinamia nespecifică“, în care arată posibilitatea influențării mecanismelor neuro-endocrine de menținere a echilibrului funcțional prin agenți farmacodinamici, care acționează nespecific în mecanismele de reglare a funcțiilor la diferite nivele. La fel propune metoda de chirurgie vegetativă — ca de exemplu în terapia anginei de piept —, prin care vizează întreruperea cercului vicios reflex permanent.

Daniel Danielopolu se situează, prin opera și concepția sa, între marile personalități medicale de la sfârșitul sec. al XIX-lea și începutul celui de al XX-lea care, desfășurând o prodigioasă activitate clinică și de laborator, au încercat, pe baza materialului faptic existent, să formuleze o teorie unitară a funcționării organismului în condiții de sănătate și de boală. Simultan lui Cannon, prin această concepție a echilibrului interstimulant, asigurat de principalele mecanisme de reglare și integrare, fiziologul român concepe o construcție teoretică pentru explicarea autoîntreținerii funcțiilor în limite constante.

Importante sînt și lucrările lui Ranson (1939), Hess (1948), Benetato (1964), F. Hoff (1933) și alții în demonstrarea funcției integrative a centrilor hipotalamici în marile reacții homeostatice. Astfel, Hess (1948) creează noțiunea de reacții ergotrope, trofotrope și endofilactice, iar Benetato, Baci u și colab. studiază, în concept homeostatic, începînd din anul 1944, răspunsul organismului (citez din prima lucrare a seriei) „împotriva agenților patogeni, precum și împotriva tuturor corpurilor care prin prezența lor în mediul intern amenință «individualitatea organică» și specificitatea chimică a organismului — cum sînt elementele celulare și proteinele străine, resturile din elementele celulare proprii și proteinele proprii denaturate“. Acest răspuns este apreciat de autor ca „un proces complex la care participă întreaga economie“. Studiul sistematic efectuat de Benetato (1964) și colab., în cea mai mare parte cu metoda „capului izolat“, asupra interacțiunii, de o parte hormoni și mediatorii, iar de alta, sistem nervos central, a adus contribuții ca cele privitoare la homeostazia calcică și la activarea cerebrală prin adrenalină și ADH.

Între aceste concepții ale echilibrelor funcționale în menținerea constanței mediului intern, s-a impus cea a lui Cannon, nu numai datorită prestigiului său mare, ci și faptului că reglarea homeostaziei a fost prelucrată, la scurt timp după moartea sa, matematic de către Wiener și Rosenblueth (cit. de Wiener, 1966) care au descoperit circuitele cu „feedback“ negativ, pe care se întemeiază homeostazia. Cibernetica, noua știință a teoriei comen-

zii și comunicației în organismele vii și în mașini, întemeindu-se tocmai pe aceste principii, a extins și conceptul de homeostazie, care o generase. Procesele fiziologice de stimulare, recepție senzorială, transmitere a impulsului, memorie, reacții efectorii vor fi expuse de acum înainte în termeni cibernetici de: intrare, codificare, semnal mesaj, decodificare, recodificare, depozitare a informației, ieșire etc. Noțiunile de sistem, subsistem, modelare matematică și tehnică a sistemelor biologice pentru a le studia proprietățile emergente, vor pătrunde în medicină și biologie și în literatura științifică. Începînd cu traducerea „Ciberneticii” de Wiener (1966) și cu lucrările lui Edm. Nicolau și Bălăceanu (1961), Săhleanu (1973), Bitman (1974), au apărut și la noi lucrări de aplicare a ciberneticii în biologie și medicină. Ele sînt incluse și în manualele universitare (Baciu, 1970, 1977). Organismul superior cu sisteme de autocontrol sau de reglare, care îi asigură independența față de mediu este privit ca un homeostat. În acest sens nu arareori termenul homeostatic este utilizat pentru a designa totalitatea mecanismelor care reglează funcțiile cardinale vegetative și de relație, care mențin organismul în stare de echilibru dinamic. Astfel homeostazia se referă la participarea continuă între anumite limite funcționale a mecanismelor integrative, care mențin constanța mediului intern, reglează desfășurarea proceselor metabolice, controlează telecinezia coordonînd mișcările complexe, reglînd amplitudinea și forța lor, care asigură apărarea organismului și procurarea hranei.

Acest conținut extins al homeostaziei derivă tocmai din implicațiile și importanța ei în întreaga fiziologie. Extinderea duce însă la pierderea valorii științifice a noțiunii. Din necesitatea unei corecții H. Laborit (1965) ale cărui preocupări de valorificare a generalizărilor fiziologiei în patologia umană sînt bine cunoscute, distinge o homeostazie generalizată, care asigură supraviețuirea organismului în totalitate într-un mediu agresiv, prin conservarea posibilităților de fugă sau de luptă, rezervînd termenul de homeostazie restrîns pentru autoreglarea mediului intern.

Dimpotrivă, alți fiziologi ca H. Patton (1965), coautor al cunoscutului manual de fiziologie și biofizică, definește doctrina lui Cannon, homeostazia, drept conceptul constanței, sub forma unei stări de echilibru, a mediului intern sau a matricei lichide a organismului.

Față de aceste accepțiuni extreme ale noțiunii de homeostazie se impun cîteva precizări. De la început ne exprimăm rezerve față de conținutul extins al noțiunii de homeostazie la totalitatea reacțiilor organismului considerat ca homeostat, noțiune ce ar acoperi

conținutul însuși al fiziologiei, nefiind astfel de nici o utilitate. La fel două noțiuni de homeostazie: restrînsă și generalizată, cum propune L a b o r i t (1963) ar da naștere la confuzii.

Din analiza istorică a conținutului său, homeostazia, așa cum a conceput-o și C a n n o n (1939) pe baza lucrărilor lui C l. B e r n a r d, (1865) designează constanța între anumite limite a compoziției mediului intern, matricea de lichid a tuturor celulelor organismelor superioare. În acest sens se poate vorbi despre o homeostazie termică, a glucozei, O_2 , CO_2 , a pH-ului, a osmolarității umorilor, a constanței anumitor ioni (Ca^{++} , Na^+ , K^+ , Mg^{++} etc.).

Menținerea homeostaziei, prin corectarea distorbanțelor sale, care apar sub acțiunea mediului înconjurător, sau ca urmare a declanșării anumitor activități individuale, care modifică mediul intern, cum ar fi exercițiul fizic, dezechilibrul nutritiv, traumatisme, hemoragii etc., se realizează prin sisteme homeostatice.

Intervenind prin mecanisme cu retroacțiune negativă aceste sisteme minimalizează diferențele între răspunsul actual și cel optim al organismelor. Unul din exemplele foarte cunoscute de funcționare a unui sistem homeostatic este restabilirea presiunii arteriale, crescută sub acțiunea unui agent perturbant, prin stimularea de creșterea a presiunii însăși, a baroreceptorilor arteriali. Prin mesaje transmise de-a lungul nervului Hering, reprezentînd cibernetice o buclă cu retroacțiune negativă, se restabilește valoarea presiunii prin creșterea tonusului centrilor cardioinhibitori și deprimarea celor cardioacceleratori. Alte exemple sînt circuitele cu feedback negativ față de excesul de hormoni, studiate de S t. M. M i l c u (1965).

Mecanismele homeostatice pot fi de natură fizico-chimică (sisteme tampon), de natură enzimatică (eliberarea și distrugerea în echilibru de polipeptide plasmatică, echilibrul coagulare-fibrinoliză), pot fi, așa cum se știe, reglări endocrine și nervoase integrate în formația reticulară, hipotalamus și în alte structuri limbice și neocorticale.

După A s h b y (1960), sistemele homeostatice cu feedback pot fi activ stabile sau activ instabile, după cum sînt programate genetic. Instabilitatea determinată genetic (ciclul menstrual), și posibilitatea de condiționare în funcție de etapele de activitate-somn (ritmul circadian) stau la originea bioritmurilor. Acordul este unanim în a aprecia rolul deosebit de important al numeroaselor sisteme cu feedback negativ, perfecționate în cursul evoluției în menținerea homeostaziei organismului uman.

Mecanismele de integrare a funcțiilor, reprezentînd mai mult decît interconectarea acestor sisteme în diferitele structuri cerebrale mai noi filogenetic, contribuie nu numai la menținerea homeostaziei

prin organizarea echilibrului funcțional al structurilor subiacente, dar pot interveni chiar prevenind efectul unor agenți nocivi asupra organismului. În această categorie se înscrie reacția simpato-adrenală, de alarmă, sau emergența studiată de C a n n o n ca model de răspuns homeostatic la frig, efort, traumatisme etc. Ea este de fapt o reacție cu feedback pozitiv, în cursul căreia se produc modificări ale constanței mediului intern și care, ca toate mecanismele cu feedback pozitiv, dacă nu este limitată, ca amplitudine și durată în timp, duce la exitus.

În această reacție, care se suprapune între anumite limite cu răspunsul ergotrop și endofilactic a lui H e s s, sau cu reacția de apărare descrisă de F o l k o w și R u b i n s t e i n (1966) sau cu reacția de alarmă din sindromul de adaptare a lui S e l y e (1965), matricea lichidiană se modifică ca urmare a mobilizării reactive a rezervelor metabolice, sub influența centrilor superiori mezodiencefalici de reglare, cu participare simpato-adrenală. Ea integrează un tip de răspuns nespecific la excitanți de intensitate, din afară sau din interiorul corpului. După U n g a r (1963), această reacție, care nu prezintă limite de intensitate, fiind lipsită de feedback negativ, poate fi considerată homeostatică în raport cu rolul ei în păstrarea integrității organismului, prin creșterea performanțelor sistemelor funcționale homeostatice. Este un răspuns în care activitatea unor sisteme homeostatice se amplifică.

ADAPTAREA FIZIOLOGICĂ

P r o s s e r (1964) a definit adaptarea fiziologică drept totalitatea proceselor ce permit menținerea activității fiziologice și supraviețuirea, când mediul de viață se modifică sub raportul unuia sau mai multor parametri. În acest sens modificări importante, ca intensitate și durată, ale unor factori din mediul intern, ale unor structuri vii proprii, ale altor viețuitoare din mediul ambiant sau ale unor factori ai acestuia, se pot solda cu dispariția sau cu supraviețuirea prin adaptare.

Față de evaluarea statistică de supraviețuire, H e n s e l (1964) propune drept criteriu funcțional al eficienței adaptării capacitatea organismului adaptat de a-și menține homeostazia în condițiile noi, schimbate. Referindu-se la eficiența aclimatizării la hipoxia de altitudine, v a n L i e r e (1942) consideră drept criterii clinice ale unei adaptări eficiente constanța greutateii corporale la adulți, păstrarea

ritmului de creștere la tineri, păstrarea apetitului, a senzației subiective de confort fizic și psihic și a capacității de reproducere.

Noțiunea de adaptare funcțională este utilizată în mai multe accepțiuni, termenul se utilizează frecvent pentru a designa exclusiv răspunsul imediat al sistemelor funcționale, declanșat prin mecanisme cu feedback pozitiv, la acțiunea agentului stressant. Adaptarea funcțională este de fapt condiționată de timp. Ea se realizează total abia într-o a doua etapă, după câteva săptămâni sau în mod total chiar ani. Această etapă este caracterizată prin modificări fizico-chimice tisulare. Instalarea acestor modificări se face progresiv, cu diminuarea răspunsurilor funcționale din prima etapă. Mecanismele nervoase nu sînt necesare pentru realizarea modificărilor tisulare (Terzioğlu și colab. 1955; Barbosova, 1959). Numai odată cu dispariția solicitărilor sistemelor homeostatice respiratorii, circulatorii, endocrine etc., reglate prin mecanisme nervoase, și cu definitivarea modificărilor biofizice și biochimice celulare, prin care se asigură homeostazia de fond, adaptarea e considerată completă. Aclimatizarea, adaptarea la mai mulți factori modificați ai mediului recunoaște mecanisme asemănătoare.

În concepția adaptării funcționale, după faza inițială nespecifică a bolii infecțioase, expresie a răspunsului funcțional la agresiune, apar modificările fizico-chimice adaptative specifice tisulare și umorale, caracteristice imunității. Ele asigură, odată cu vindecarea, restabilirea homeostaziei în organismul imun.

În concluzie, homeostazia și adaptarea funcțională reprezintă două concepte fundamentale ale biologiei și medicinei contemporane.

Bolile de reglare reprezintă deficite sau excese în funcționarea sistemelor homeostatice sau în desfășurarea proceselor adaptative în sensul că acestea nu sînt în măsură să mențină homeostazia în noile condiții modificate. În acest context, terapia patogenetică nespecifică reclamă cunoașterea mecanismelor homeostatice și adaptative.

În sfîrșit, conceptul de adaptare poate fi extins și în domeniul psihofiziologiei, știința ce se dezvoltă impetuos, impulsionată de cibernetică și de teoria informației, pe bazele metodologiei fine electrofiziologice, de microscopie electronică și cu ajutorul ultramicrometodelor biochimice.

Astfel, memoria, depozitarea informațiilor în creier, poate fi concepută ca un proces adaptativ, a cărui etapă funcțională este circulația informației în circuitele reverberante (memoria imediată) iar etapa de modificări fizico-chimice celulare coincide cu elaburarea de polipeptide informaționale, a conectorilor, al căror rol

în bătătorirea sinapselor, întrezărită de P a v l o v, în formarea reflexului condiționat, a fost recent demonstrată de U n g a r și colaboratorii.

Pentru viața contemporană, care se dezvoltă în condiții de mediu ce suferă mari transformări, pentru necesitățile de viitor ale omenirii de a popula regiunile de altitudine și eventual zone subacvatice, de cucerire în perspectivă a spațiului cosmic, cât și pentru prevenirea și tratarea bolilor, pentru consolidarea sănătății cunoașterea mecanismelor de funcționare a sistemelor homeostatice și a condițiilor optime și limitelor adaptabilității lor sînt din cele mai importante.

HOMEOSTAZIA OXIGENULUI

Homeostazia oxigenului dizolvat în umori se realizează în sistem deschis întrucît aportul de oxigen este de proveniență externă, atmosferică. Sensorii pentru reglarea aportului se găsesc dispuși în principal în sistemul de intrare a oxigenului spre țesuturi, în segmentul arterial, fiind reprezentați de chemoreceptorii sino-carotidieni și cardioaortici.

În prima etapă a expunerii la hipoxie, deficitul de oxigen acționează inițial asupra zonei chemoceptive sino-carotidiene și celei aortice, mai puțin sensibilă.

Excitarea chemoceptivă sino-carotidiană produce seria de reflexe de compensare a deficitului de oxigen: respiratorii și circulatorii. Simultan, sub control nervos se produce o altă repartizare a sîngelui între organe, mobilizarea de eritrocite din splină și de reticulocite din măduva osoasă. Creșterea permeabilității capilare determină o trecere de lichid plasmatic în spațiile interstițiale cu reducerea volumului plasmatic. Se realizează astfel o poliglobulie imediată relativă, de repartiție.

Excitarea directă nervos centrală prin hipoxie are ca efect, printr-un mecanism neuro-umoral, un răspuns simpatoadrenal, cu creșterea excreției de catecolamine urinare. Prin mecanisme ce vor fi analizate în capitolele următoare, are loc eliberarea de eritropoetină.

Poliglobulia ce apare în adaptarea la hipoxie, măbind capacitatea de fixare și transport a O_2 de către sînge, reduce semnificativ accelerarea respiratorie la animalele adaptate, expuse la hipoxie.

Animalele adaptate răspund la hipoxie printr-o mai promptă accelerare respiratorie, la progresiunea hipoxiei.

Între modificările celulare prin care se realizează adaptarea la hipoxie în a doua etapă sînt importante creșterea difosfogliceralului în eritrocite, creșterea mioglobinei musculare și proliferarea capilarelor în unele organe. O p i t z și colab. (1941) au descris creșterea capilarizării mușchilor, R e i n și S c h n e i d e r a creierului. B a c i u, D e r e v e n c o și P a v e l (1963) au arătat, prin măsurări cu ^{86}Rb , creșterea irigației măduvei osoase sub acțiunea hipoxiei și a eritropoetinei. Cu dezvoltarea acestor modificări fizico-chimice și enzimatică tisulară la hipoxie, reacțiile funcționale imediate circulatorii și respiratorii se atenuează progresiv.

Cunoașterea mecanismelor homeostatice de control ale adaptării de durată la hipoxia ambiantă și tisulară prezintă importanță teoretică și aplicativă pentru patologia circulației, a respirației și a funcției sanguine de fixare, transport și cedare a oxigenului.

Prevenirea, corectarea și extinderea limitei de adaptare la hipoxie, în practica chirurgicală, la subiecții ce trăiesc la mare altitudine, în navigația aeriană și astronomică, în eforturi de intensitate, intra și postpartum și în cursul nașterii reprezintă probleme de rezolvat ce justifică necesitatea cunoașterii mecanismelor de control ale adaptării la hipoxie.

În conceptul homeostaziei, aportul de oxigen, șocul de orice natură apare ca o insuficiență a unuia sau mai multor sisteme homeostatice, în serviciul acestui important factor al mediului intern. În șocul neprogresiv, altădată numit compensat, restul mecanismelor homeostatice încă funcționale sînt în măsură să mai asigure homeostazia oxigenului. În șocul progresiv se realizează, prin insuficiența mecanismelor homeostatice, o datorie de O_2 în progres, iar în cel ireversibil, după date recente din literatură, deficitul de O_2 neacoperit pentru 1 kg țesut depășește 120 ml O_2 (C r o w e l l, 1965).

Rezultă deci, că în serviciul homeostaziei oxigenului dizolvat în lichidul interstițial, în mediul intern al organismului, de unde acesta aprovizionează celulele, intervin foarte numeroase sisteme funcționale. Complexitatea mecanismelor homeostatice ale O_2 tisular se explică prin aceea că în celule neexistînd rezerve de O_2 , orice creștere a activității metabolice a acestora determină scăderea presiunii parțiale a O_2 dizolvat în lichidul tisular, ceea ce perturbă, după o latență extrem de scurtă, homeostazia. Intervin rapid mecanismele homeostatice locale (creșterea irigației și a coeficientului de disociere a oxihemoglobinei sub acțiunea cataboliților acizi, care declanșează și reacții reflexe). Acestora li se adaugă reflexe circulatorii cu caracter intersegmentar și general, precum și respi-

ratorii, integrate la diferite nivele. Hipoxia și hipercapneea acționează chemoceptiv sino-carotidian și aortic, precum și direct asupra centrilor nervoși vegetativi aparținând formației reticulare și asupra zonei hipotalamice, producând răspunsul integrat respirator, circulator și secreția de eritropoetină, precum și a altor hormoni cu ecou asupra sistemului funcțional sanguin și asupra vaselor. Originea embrionară comună a eritrocitelor cu endoteliile vasculare ale capilarelor argumentează nu numai pentru funcții comune și asociate ci și pentru existența unei integrări funcționale a acestor sisteme în sistemul nervos central.

În concluzie, datele clasice de fiziologie demonstrează integrarea tuturor acestor sisteme în etajele superioare de reglare a funcțiilor vegetative, ale sistemului nervos central, în serviciul aportului, transportului și eliberării tisulare a oxigenului, unde concentrația sa, sub formă dizolvată în lichidul interstițial se menține la valori foarte stabile, reprezentând o importantă constantă homeostatică.

REGLAREA RESPIRAȚIEI ȘI CIRCULAȚIEI ÎN HOMEOSTAZIA OXIGENULUI

CHEMORECEPTORII

Reglarea chimică a constanței P_{O_2} tisular se realizează prin mecanisme cu caracter local și prin modificări ale ventilației pulmonare, ale componentilor sîngelui și ale debitului circulator, în menținerea tensiunii oxigenului tisular prin reglarea aportului de oxigen, mai exact al homeostaziei tisulare a acestui gaz.

Reglarea fină a homeostaziei oxigenului și integrarea importanțelor funcții cu rol în menținerea constanței principalului gaz respirator se face de către sistemul nervos. Procesul deosebit de complex necesită prezența unor chemoreceptori, diferențiați, care recepționează informații relativ la P_{CO_2} , $[H^+]$ și la scăderea P_{O_2} în sîngele arterial. Chemoreceptorii au o importanță fundamentală în menținerea P_{O_2} tisular. Este însă de subliniat că cea mai mare sensibilitate la creșterea P_{CO_2} , sanguin și a H^+ o au receptorii localizați în zona centrală. Dacă se apreciază că O_2 prin arderile tisulare se transformă într-o cantitate practic echivalentă de CO_2 , atunci intensificarea utilizării metabolismului acestora se activează, este urmată de eliberarea unor cantități de CO_2 , proporțional crescute cu utilizarea O_2 . Difuzibilitatea mai mare a CO_2 face ca răspunsul compensator să fie mai prompt. Chemoreceptorii pentru O_2 , situați în teritoriul arterial au o sensibilitate relativ mai redusă față de scăderea P_{O_2} arterial. Din acest motiv la scăderea concentrației O_2 în aerul respirat de la 21% pînă la 12% nu apar modificări foarte însemnate ale respirației și ventilației. Ele devin însă importante la 8%—4% O_2 în aerul respirat. Efectul $[H^+]$ asupra respirației este intermediar între creșterea P_{CO_2} , venos și scăderea P_{O_2} arterial.

Procesul primordial și principal al schimburilor gazoase este după toate datele oxigenarea. La pești, cu respirație branhică, spre exemplu, mișcările respiratorii ale branhiilor sînt influențate de P_{O_2} din apă. Scăderea presiunii parțiale a O_2 dizolvat activează mișcările, pe cînd creșterea presiunii CO_2 nu are efect (K r o g h).

Corpusculii sino-carotidian și cardio-aortic ar reprezenta deci supraviețuirea unor chemoreceptori de mare importanță, deși la mamifere s-au dezvoltat mecanisme de reglare a oxigenării sensibile la CO_2 și $[\text{H}^+]$.

Au fost evidențiate două categorii de chemoreceptori.

Chemoreceptori periferici sau arteriali, reprezentați de corpusculii carotidian (De Castro, 1926) și aortic. fig. 10. Ei răspund rapid la modificarea P_{O_2} , P_{CO_2} și $[\text{H}^+]$ în sângele arterial așa cum a demonstrat Heybans și colab. (1939), distins pentru aceasta cu Premiul Nobel în 1938.

Chemoreceptori centrali, situați în formația reticulară a trunchiului cerebral, sînt sensibili la modificările în sângele arterial ce irigă aceste zone și în lichidul interstițial ambiant ale P_{CO_2} și $[\text{H}^+]$.

CHEMORECEPTORII PERIFERICI

Chemoreceptorii sino-carotidieni sînt situați în corpusculii carotidieni, legați de centrul respirator bulbar prin fibre aferente ale nervilor sinusali (Hering) anexați nervilor glosofaringieni.

Reacțiile provocate de stimularea chemoreceptorilor sînt complexe, interesînd îndeosebi respirația și circulația sîngelui. Stimularea produce creșterea volumului respirator curent, a frecvenței și a ventilației pe minut, iar asupra circulației determină vasoconstricție sistemică, exceptînd vasele cutanate, și bradicardie. Bradicardia apare ca rezultat direct al stimulării corpusculului carotidian, dar este mascată de un reflex pulmonar, activat de distensia plămînilor. Cînd acesta lipsește se produce cu regularitate bradicardie. Stimularea chemoreceptorilor mai produce creșterea forței de contracție a ventriculului stîng, hipertensiune arterială, creșterea rezistenței vasculare pulmonare (prin corpusculul aortic), și creșterea tonusului bronșic. Ea activează secreția medulo, corticosuprarenalei și a posthipofizei. Pe traseul EEG apar semnele caracteristice activării electrice corticale.

Prin unele din aceste reacții se realizează mărirea aportului de oxigen, altele constituind mecanisme compensatorii la modificările respiratorii și circulatorii induse.

Relativ la rolul identic sau diferit al corpusculilor carotidieni și aortici, s-a considerat că cei din urmă reprezintă structuri mai puțin sensibile decît primii la stimularea prin hipoxie. Au fost

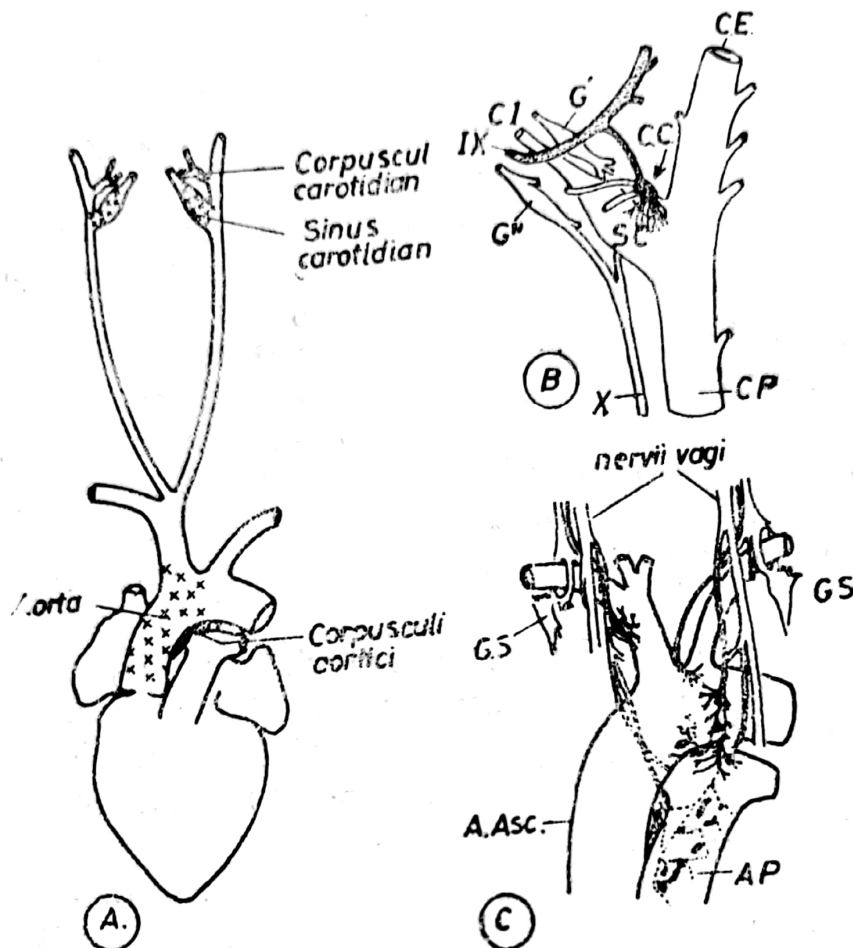


Fig. 1. Corpusculii carotidieni și aortici la câine.
 A. Localizarea aproximativă a chemoreceptorilor carotidieni și aortici (ovale negre) și a baroreceptorilor (cruci).
 B. Corpusculii carotidieni (CC) primesc sângele arterial din artera occipitală, care este prima ramură a carotidei externe (CE). Fibrele lor aferente urmează traiectul ramurei carotidiene a perechii 9-a cranienne. X = nervul vag; CP = = artera carotidă primitivă; SC = sinus carotidian; CI = = carotidă internă; G' = ganglionul simpatic cervical superior și G'' = ganglionul plexiform al vagului.
 C. Celulele chemoreceptoare aortice sînt grupate pe suprafața anterioară (ovale negre) și posterioară (ovale hașurate) a cîrjei aortice și a arterei pulmonare (AP); ele primesc sângele de la o ramură mică a cîrjei aortice. GS = ganglion stelat; A. Asc. = aorta ascendentă (după Comroe, 1978)

demonstrate însă și acțiuni specifice. Astfel, stimularea corpusculului aortic determină vasoconstricție pulmonară, tahicardie și hipertensiune sistemică. Stimularea glomusului carotidian produce dimpotrivă bradicardie.

Stimulii naturali ai chemoreceptorilor periferici sînt scăderea P_{O_2} arterial, precum și creșterea CO_2 și a H^+ în sângele arterial.

Efectul stimulării, sub raportul intensității răspunsului receptorilor, se apreciază în funcție de creșterea frecvenței potențialelor în fibrele aferente și de răspunsul respirator și circulator. Astfel reducerea saturației cu O_2 a sîngelui arterial de la 96% la 94% determină creșterea frecvenței potențialelor în nervii Hering. Cercetările efectuate relativ la rolul chemoreceptorilor în reglarea respirației par să arate că unele celule chemoreceptoare, sub acțiunea valorilor fiziologice (100 mm Hg) ale P_{O_2} arterial, ar avea o activitate tonică. Ea dispare după respirarea unui amestec cu 33% O_2 . Hipoxemia stimulează însă un mare contingent de receptori, numai cînd P_{O_2} arterial scade la 40—50 mmHg. Sensibilitatea maximă a chemoreceptorilor sino-carotidieni, se situează între 70 și 30 mmHg P_{O_2} cînd, la variații mici ale P_{O_2} arterial, răspund prin modificări însemnate ale frecvenței biopotențialelor generate în fibrele aferente.

Sensibilitatea chemoreceptorilor arteriali la P_{CO_2} este mai mare și are caracter linear, ei răspunzînd la variații de 1—2 mmHg P_{CO_2} și la fel față de H^+ sîngelui arterial. Cînd acești factori acționează simultan, amplitudinea răspunsului depășește mărimea sumei celor două răspunsuri individuale.

În condiții normale, intervenția chemoreceptorilor sinusali și aortici este apreciată ca minimă în homeostazia O_2 . După unii autori este chiar contestabilă deoarece la subiecți umani cu ablația bilaterală a corpusculilor carotidieni, lipsește răspunsul respirator la hipoxia moderată. Intervenția lor apare însă deosebit de importantă în stările de hipoxemie acută. Astfel, după denervarea zonelor chemoceptive arteriale la cîini, la respirarea de amestecuri sărace în O_2 , inițial ventilația pulmonară se reduce, plauzibil datorită deprimării centrului respirator prin hipoxie. Hiperpneea care se instalează este mai tardivă în comparație cu cea de la animalul intact, caracterizîndu-se prin creșterea frecvenței respiratorii și prin scăderea volumului de aer curent.

În cursul hipoxemiei acute, presiunea arterială crește, creștere prezentă și după denervarea zonelor sinocarotidiene. Hipertensiunea este determinată de eliberarea de catecolamine, care prin receptorii alfa-adrenergici determină vasoconstricție periferică directă, iar prin receptorii beta eliberează renină, cu generarea angiotensinei, la fel cu efecte vasoconstrictoare. Creșterea angiotensinei în sînge, dozată radioimunologic în cursul unei hipoxemii provocate prin respirarea unui amestec de 8% O_2 , precum și atenuarea pînă aproape la dispariție a răspunsului hipertensiv după alfa și beta

blocante a fost descris de Baci u, Grosu, Barabaș, Olteanu și Vlasie (1980).

În hipoxemia cronică (viață la altitudine, boli cardiovasculare), chemoreceptorii periferici, care se adaptează foarte greu, continuă să răspundă practic indefinit (fig. 2). Există totuși un procent de asemenea bolnavi la care chemoreceptorii în condiții de hipoxie prelungită își pierd sensibilitatea. La aceștia înhalarea de oxigen nu deprimă respirația, nici măcar prin scăderea ventilației cu 30%, ca la subiecții sănătoși. Alteori respirația

oxigenului de către bolnavi hipoxemici nu deprimă respirația din cauza shunturilor arteră-venă pulmonară, a viciilor de circulație congenitale, sau în caz de congestie pulmonară, precum în care oxigenoterapia nu mărește gradul oxigenării sîngelui arterial.

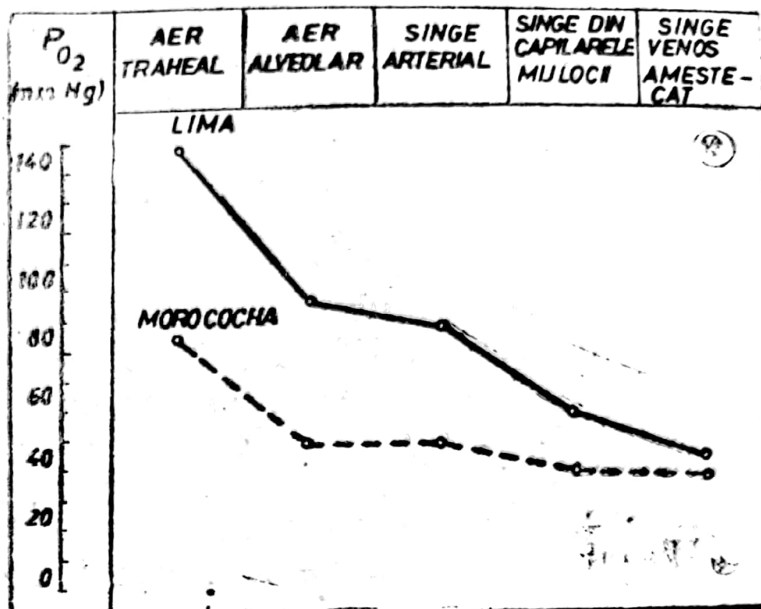


Fig. 2. Scăderea presiunii parțiale a oxigenului din aerul traheal pînă la sîngele mixt venos, pulmonar la locuitorii din Lima (malul mării) și Marochoha (altitudine de 5400 m). Valorile medii a cîte 8 subiecți de sex masculin sănătoși. (după A. Hurtado în: The Physiological Effect of High altitude. Ed. by W. H. Weine. Pergamon Press Oxford-London 1964)

CHEMORECEPTORII CENTRALI

Denervarea chemoreceptorilor periferici — cei doi corpusculi carotidieni și aortici — influențează neînsemnat răspunsul respirator al animalelor la inhalare de CO₂. Dacă, dimpotrivă, se perfuzează sinusurile carotidiene cu sînge în care P_{CO₂} este mărită cu 20 mmHg sau dacă se inspiră aer în care CO₂ este de 10%, se produce o activare însemnată a respirației. Respirația nu se modifică la creșteri ale P_{CO₂} arterial sub 10 mm Hg în zona chemoreceptorilor arteriali.

Animalul întreg răspunde însă la creșteri ale P_{CO₂} de 2—4 mmHg, ceea ce ilustrează că CO₂ acționează, activînd respirația,

în primul rând asupra altor structuri receptoare mai sensibile decât chemoreceptorii arteriali periferici.

Aceste structuri au fost mult timp identificate cu neuroni ai centrului respirator, asupra cărora CO_2 și în sens mai larg $[\text{H}^+]$ ar exercita un efect stimulator. Mitchell, Loeschcke, Severinghaus, Richardson și Massion (1963), Mitchell și Severinghaus (1965) au descris însă, pe suprafața ventrală a bulbului la locul de emergență și puțin inferior acestuia a nervilor IX, X și X, o zonă avînd o profunzime de 200 μ , care conține celule sensibile la modificările H^+ din lichidul cefalorahidian și din sîngele care o irigă. De fapt dacă stimulul e reprezentat de H^+ , efectele cele mai prompte le produce totuși CO_2 , care difuzînd rapid în interiorul celulei receptoare generează CO_3H_2 cu eliberarea de H^+ . Acești receptori nu constituie un centru, ci reprezintă, prin analogie cu receptorii periferici, chemoreceptori centrali. Structura celulelor lor receptoare nu este însă identificată.

Prin chemoreceptorii centrali nu se declanșează reflexe cardio-circulatorii; acești receptori nu sînt influențați de P_{O_2} . Răspunsul chemoreceptorilor centrali la creșterea brutală a P_{CO_2} este mai lent decât al receptorilor periferici. S-a sugerat ideea (Comroe 1978) că localizarea chemoreceptorilor centrali aproape de suprafața bulbului și răspunsul lor la modificarea H^+ lichidului cefalorahidian ar putea explica rolul lor în menținerea pH lichidului cefalorahidian, în timp ce corpusculii carotidieni și aortici intervin în reglarea P_{O_2} și în condiții extreme a P_{CO_2} și pH sîngelui arterial sistemic. Întreruperea circulației cerebrale sau reducerea sa exprimată, generînd acidoză în lichidul extracelular cerebral și în lichidul cefalorahidian ar putea constitui mecanismul intensei ventilații pulmonare în ischemia cefalică. Constatarea situării chemoreceptorilor centrali în afara centrilor respiratori bulbari explică observația că uneori în anestezia profundă dispare sensibilitatea centrului respirator la CO_2 . Fenomenul s-ar putea explica prin acțiunea narcotică, știut fiind că la om 50% CO_2 în aerul respirat diminuează reflexul corneean, concentrații mai mari avînd efect narcotic.

Latența și perioada relativ lungă în care crește ventilația pulmonară, precum și revenirea lentă la normal la respirarea unui amestec bogat în CO_2 (5—10%) explică punerea mai îndelungată în echilibru a chemoreceptorilor centrali cu sîngele arterial, prin intermediul CO_2 și H^+ lichidului interstițial și cefalorahidian. Dimpotrivă, latența este foarte scurtă la stimularea chemoreceptorilor periferici, prin scăderea P_{O_2} , creșterea CO_2 și H^+ , întrucît debitul circulator foarte ridicat glomerular (2000 ml/100 g/min) asigură

contactul rapid al gazelor singelui circulant cu structurile receptoare chemosensibile. Întrucît natura chemoceptorilor centrali nu este încă precizată, cum nu sînt precizate nici raporturile lor cu neuronii centrului respirator, s-a acceptat denumirea de unități centrale chemoceptive.

ROLUL ZONELOR CHEMOCEPTIVE ÎN REGLAREA RESPIRAȚIEI

În lumina acestor noi fapte există tendința de a se aprecia că neuronii centrului respirator ar fi lipsiți de proprietăți chemoceptive. Influențele chemoceptive asupra lor se exercită pe cale reflexă, de la zonele receptoare periferice și centrale.

Întrebarea ce apare firesc în final este în ce măsură diferitele zone chemoreceptoare intervin în homeostazia oxigenului.

Revenind la scăderea P_{O_2} , arterial, care determină, după o latență scurtă, dar numai la scăderi ale P_{O_2} , de la 100 mmHg la sub 10 mmHg, un răspuns ventilator și presor, se poate afirma rolul chemoreceptorilor arteriali, stimulați în hipoxie, în mărirea aportului alveolar de oxigen și — prin creșterea forței de contracție a ventriculului stîng și hipertensiune — în creșterea debitului circulator și de oxigen spre țesuturi. La obiecția că acest mecanism ar fi prea puțin sensibil, întrucît este evident activ numai la scăderi mari ale P_{O_2} , arterial, trebuie precizat că, prin disocierea oxihemoglobinei pînă la valori ale P_{O_2} , de 60—70 mmHg, oxigenarea țesuturilor este încă asigurată. În aceste condiții stimularea chemoreceptorilor arteriali e în măsură să restabilească prin reflexele respiratorii și circulatorii, oxigenarea la valoarea P_{O_2} , de 100 mmHg.

În aceste condiții de funcționare normală, unitățile chemoceptive centrale sensibile la CO_2 și H^+ ar avea rol mai ales de reglare și menținere prin intervenția promptă reflexă a centrilor respiratori, a concentrației H^+ din țesuturi și, în primul rînd, din țesutul nervos.

RESPIRAȚIA PULMONARĂ ȘI HOMEOSTAZIA OXIGENULUI

Ventilația pulmonară are rolul de a primeni aerul alveolar, menținând, prin frecvența și amplitudinea sa, reglate în raport de tensiunea CO_2 din sângele venos și a O_2 din sângele arterial de către centrii respiratori, valori constante, în limite foarte strânse, a acestor gaze în aerul alveolar. Ea presupune integritatea funcțională a centrului respirator, cu conexiunile sale intercentrale aferente și eferente, integritatea funcțională a mușchilor respiratori toracici și a diafragmului, presiunea negativă intrapleurală, elasticitatea plămînilor, elasticitatea cutiei toracice și permeabilitatea căilor pulmonare aeriene.

REZISTENȚELE RESPIRATORII

În căile aeriene, aerul se deplasează din zonele cu presiune ridicată spre segmentele cu presiune inferioară. Forța care asigură deplasarea aerului, în inspirație dinspre aerul atmosferic spre alveolele care se destind, realizându-se astfel în interiorul lor o presiune negativă, este reprezentată de contracția mușchilor inspiratori. Ea este egală, conform principiului acțiunii și reacțiunii, cu rezistența tuturor factorilor ce se opun expansiunii cutiei toracice în inspirație.

Rezistențele care se opun mișcărilor cutiei toracice și plămînilor și curgerii aerului reprezintă rezistențele respiratorii totale (RT) (fig. 3).

a) Rezistențele cutiei toracice sînt în mod normal egale, sau cu puțin superioare, celor ale căilor aeriene. Rezistența tisulară pulmonară și a căilor aeriene periferice sînt neglijabile. Rezis-

tență nazală e de 2—3 ori mai mare decât a totalității căilor aeriene.

b) Rezistența pulmonară (R_L) cuprinde rezistența țesutului pulmonar (R_{Lt}) și rezistența căilor aeriene (R_{aw}), superioare (R_{aws}) (gură, faringe, glotă) și inferioare (R_{awi}) (începînd cu traheea), căile aeriene inferioare cu o zonă centrală (traheea pînă la bronșiile cu un diametru superior de 2 mm) și periferică (R_p), în continuarea precedentelor. Rezistența căilor aeriene superioare e cel puțin egală cu a celor inferioare.

Tehnicile moderne de explorări respiratorii permit măsurarea acestor rezistențe.

Rezistența elastică a țesutului toraco-pulmonar, denumită și recul elastic, se stabilește prin raportul presiune-volum. Cu cît în timpul inspirației presiunea aplicată prin forța de contracție a mușchilor inspiratori este mai mare, cu atît volumul cutiei toracice crește mai mult și cu atît se înmagazinează mai multă energie potențială în structurile elastice toraco-pulmonare. Măsurarea acestui raport în condițiile explorărilor funcționale respiratorii nu se face pe toată întinderea sa, ci se limitează la zona în care relația este lineară, deci în zona respira-torie fiziologică. Pe această curbă presiunea, măsurată prin sondă cu balon situat în esofag, se exprimă în cm coloană de H_2O , iar volumul măsurat cu spirometrul, în ml. Raportul dintre modificarea de volum și variația de presiune constituie *complanța*.

$$C_L = \frac{dV}{dP}$$

Valoarea normală a complanței pentru un subiect adult este de $200 \pm 30 \text{ ml} \times \text{cm } H_2O^{-1}$.

Complanța este direct proporțională cu distensibilitatea structurilor elastice toraco-pulmonare, scăderea ei notînd o rigiditate

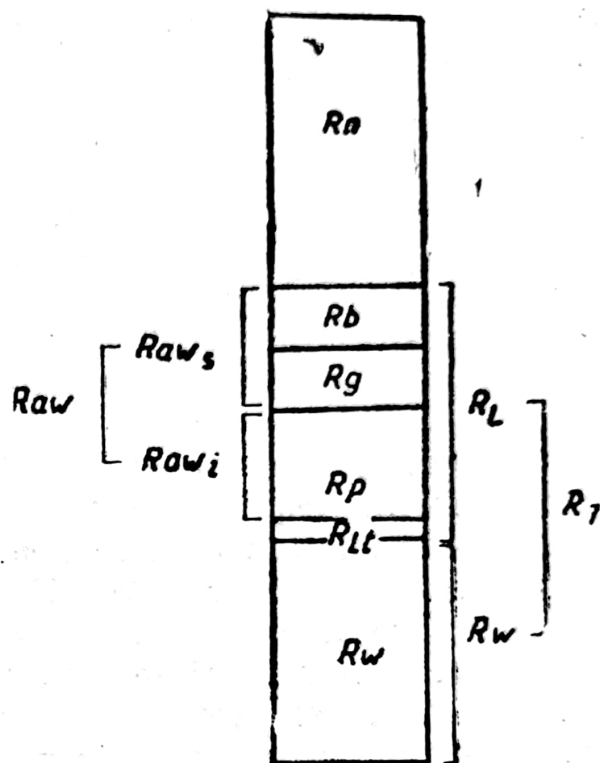


Fig. 3. Rezistențele respiratorii. Distribuția longitudinală a rezistențelor căilor aeriene: R_T = rezistența totală toraco-pulmonară; R_W = rezistența peretelui toracic; R_L = rezistența pulmonară; R_{aw} = rezistența căilor aeriene (superioare: s; inferioare: i); R_b = rezistența buco-faringiană; R_g = rezistența glotică; R_c = rezistența căilor aeriene centrale; R_p = rezistența căilor aeriene periferice; R_n = rezistența nazală; R_{Lt} = rezistența țesutului pulmonar.

a acestora, cu ventilarea unui volum mai mic de aer. Se poate măsura separat complianța toracică și pulmonară.

Rezistența de curgere în căile aeriene depinde în primul rând de vîscozitatea și densitatea gazului circulant, cu care crește în mod linear. Aceasta se poate demonstra înlocuind azotul cu gaze inerte, mai mult sau mai puțin dense.

În hiperbarism se întâlnește același raport care, pînă la 3—4 atmosfere, este direct linear cu densitatea. Pentru a reduce travaliul respirator, mărit în condiții hiperbare, la scafandri, azotul este înlocuit în amestecul de respirat cu heliu, de densitate redusă.

Curgerea este turbulentă în căile aeriene superioare, mai ales cînd debitul respirator este crescut, ca în efort, și laminară în conductele de diametru mic, în care viteza e redusă progresiv cu creșterea suprafeței de secțiune. De aceea rezistența de curgere este mai mare în segmentele superioare. De fapt în căile respiratorii, aerul nu circulă în mod tipic turbulent sau laminar, ci într-un regim în care vitezele și direcția precum și caracterul curgerii, cu prilejul bifurcațiilor bronșice în repetiție, se modifică. În acest regim de curgere „în condiții de intrare” în respirația spontană, pierderile de presiune tind să se apropie, deci energia mecanică cheltuită este aproximativ identică. Sub raport fizic, curgerii aerului prin căile aeriene i se opun rezistențe vîscoase sau de fricțiune și inerțiale sau de accelerație. Ele depind de vîscozitatea și densitatea gazelor ventilate, așa cum s-a menționat, de netezimea căilor aeriene, asigurată de epiteliul și stratul de lichid surfactant cu proprietăți tensioactive, de prezența unui strat mai gros de mucus, de congestia vaselor endobronșice, de calibrul bronșiilor, reglat umoral și nervos, precum și de factori parenchimatoși (deformarea țesuturilor neelastice ale plămînilor) în procesul de ventilație. Modificarea lor, în sensul creșterii, se repercutează negativ asupra debitului respirator, fiind generatoare de hipoxie. Expresia clinică a acestor procese cu patologie pulmonară este sindromul obstructiv, generator de mari perturbări ale homeostaziei oxigenului.

Una din reacțiile adaptative funcționale în sindromul obstructiv este creșterea travaliului respirator; crește astfel consumul de oxigen al mușchilor respiratori în condițiile avansate ale obstrucției bronșice. La o ventilare de 10 l/min, în condițiile sindromului obstructiv, travaliul respirator poate crește la un consum de O_2 necesar ventilării în condiții normale de 100 l/min. În acest mod, o mare parte din oxigenul reținut de organism este sustras necesităților metabolice generale, fiind consumat de mușchii respiratori. Solicitări metabolice crescute (efort, febră), cu mărirea cerințelor

de oxigen, duc la decompensarea respirației și la apariția insuficienței respiratorii cu hipoxemie, hipercapnie, acidoză. Este de notat că în asemenea situații există zone alveolare total neventilate, în rest ventilația fiind redusă.

O parte din aerul care pătrunde în plămâni nu ajunge în zona în care se produc schimburile respiratorii, adică în alveolele pulmonare, ci rămâne în porțiunea superioară a arborelui respirator în care nu au loc asemenea schimburi. Din acest motiv, nu conține CO_2 expirat. Ea poartă denumirea de spațiu mort și anatomic se întinde de la orificiile nazal și bucal pînă la bronșiolele terminale. La subiecții sănătoși este identic cu cel funcțional și reprezintă o fracțiune a volumului respirator:

$$V_D = 0,33 \cdot V_T$$

Spațiul mort funcțional poate fi determinat cu o substanță test. Se poate utiliza în acest caz CO_2 . Dacă $V_D = V_T$, ventilația alveolară devine nulă. Creșterea spațiului mort funcțional este astfel un factor perturbant al homeostaziei O_2 .

Modificările ventilatorii (frecvență, amplitudine), reglate neuro-umoral și neuro-reflex, asigură homeostazia O_2 și CO_2 .

În inspirație, aerul atmosferic pătrunde pînă în spațiile alveolare, unde oxigenul difuzează în sângele capilar. Aerul expirat conține în jur de 16% O_2 și 4% CO_2 , restul fiind azot și gaze nobile. Volumul de gaz inspirat (tidal volume: simbol V_T) este de 500—600 ml, din care ~ 150 ml (30—35%) este volumul din spațiul mort (V_D). Deci numai 70% din ventilația pulmonară este eficientă.

Normoventilația sau ventilația normală menține o concentrație în CO_2 de 5,7% (40,3 mmHg) și în O_2 de 14% (100 mmHg) în aerul alveolar. Creșterea ventilației peste nevoile metabolice ale organismului determină scăderea CO_2 și creșterea O_2 alveolar, constituind hiperventilația. Procesul contrar este hipoventilația. Este de subliniat că în aceste situații CO_2 alveolar oscilează față de 5,7% cu $\pm 0,2$. De aceea, întrucît procentul alveolar de gaze nu se modifică prea mult cu intensitatea metabolismului, reprezentînd o constantă homeostatică, sub raportul concentrației alveolare a gazelor, modificarea respirației în efort fizic nu este *hiperventilație*, ci *hiperpnee* ea exprimînd mai corect necesitățile metabolice. Respirația normală de repaus este designată ca *eupnee*. *Hipopneea* este o ventilație scăzută anormal. Noțiunea de *dispnee* indică prezența unei dificultăți respiratorii subiective, iar obiectiv de cele mai multe ori creșterea H^+ sau CO_2 în sângele arterial. În *apnee*, subiectul nu mai respiră (la sfîrșitul hiperventilației).

SCHIMBUL ALVEOLAR DE GAZE

Difuzia. S-a arătat că prin membrana alveolo-capilară, schimburile de O_2 și CO_2 se fac după legile fizice, prin difuzie (fig. 4).

Mișcarea pasivă a moleculelor de gaz de la un punct de concentrație ridicată, spre unul cu concentrație coborâtă, proces denumit difuzie, cauzează trecerea gazului din aerul alveolar prin membrana alveolo-capilară spre eritrocite, unde O_2 se fixează pe hemoglobină. Practic membrana e foarte subțire, grosimea medie fiind de $1,75 \mu m$. Are o suprafață de $70-90 m^2$. Membrana alveolo-capilară conține trei elemente: capilarele, interstițiul și epiteliul de înveliș alveolar. Capilarele reprezintă 60% din suprafața membranei și vin în contact intim cu $3/4$ din suprafața sa, ceea ce totalizează o suprafață de schimb de $50 m^2$.

Gazul	Presiune parțială (mm Hg)			
	Aer alveolar	Membrană alveolo-capilară	Sînge venos	Diferențe
Oxygen	105	→	40	65
Bioxid de carbon	40	←	46	6
Azot	568	↔	570	
Vapori de apă	47		47	

Fig. 4. Difuzarea gazelor prin membrana alveolo-capilară.

Epiteliul alveolar este de origine endodermică, fiind format din două tipuri de celule: pneumocitele I, lipsite practic de organite intracelulare, din acest motiv foarte fragile la agresiuni, și pneumocitele II, care acoperă numai 45% din suprafață, conțin organite, sînt mai rezistente și au capacitatea mare de regenerare. Un număr de macrofage apar pe suprafața endotelială, acoperite de prelungiri ale citoplasmei pneumocitelor I. Pe suprafața epiteliului alveolar se găsește stratul de glicocoli, alcătuit din heteropolizaharide, receptori specifici ai anumitor semnale moleculare. Acest strat este acoperit la rîndul său de filmul apos endoalveolar, hipofaza. Grosimea acestui strat e în medie de $300 nm$, conținînd proteine plasmatică, îndeosebi albumină. El este tapetat de pelicula tensioactivă a surfactantului pulmonar, cu grosime de $10-50 nm$, for-

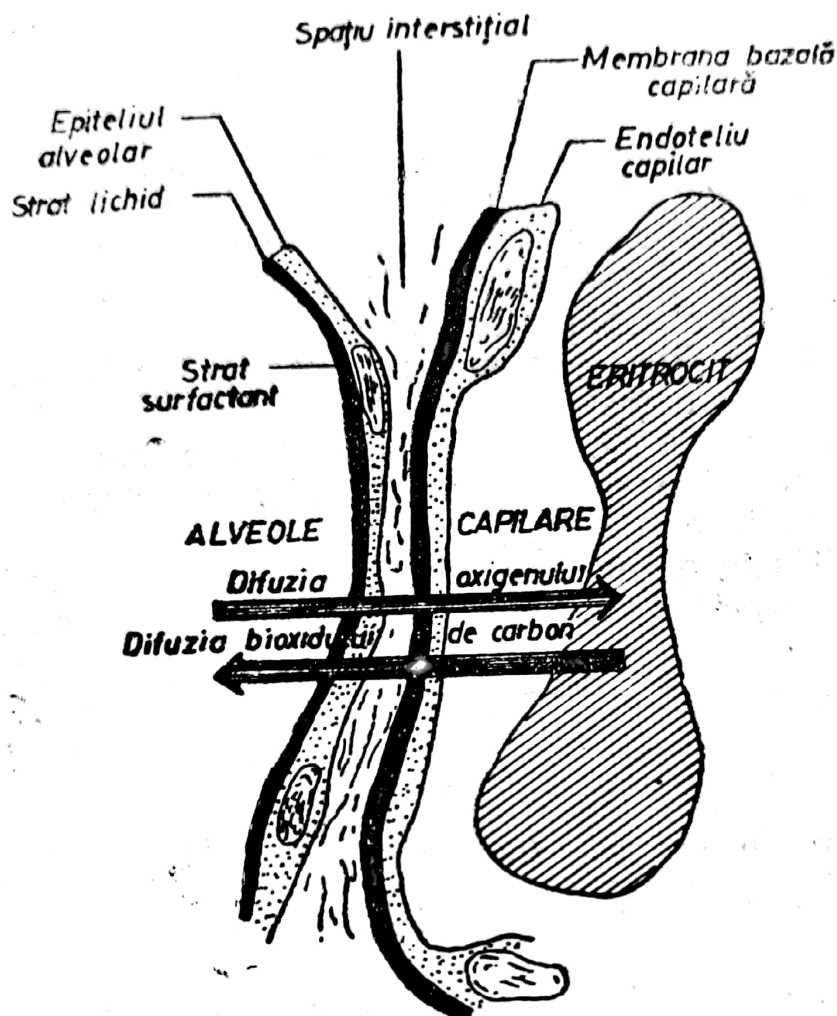


Fig. 5. Membrana alveolo-capilară.

mată din proteine specifice și din dipalmitoilfosfatidcolină. Celulele epiteliale sînt fixate pe o membrană bazală cu grosimea de 80 nm.

Capilarele pulmonare au diametrul de 5—7 μm , fiind alcătuite din stratul endotelial și membrana bazală. Celulele endoteliale formează un strat continuu; ele conțin vezicule. Capilarele pulmonare sînt foarte dense, formate din segmente mai scurte și lipsite de sfinctere. În realitate, ele pot fi concepute ca limitînd un strat continuu de sînge, în contact cu aerul alveolar. În condiții de repaus, la om, aproximativ 140 ml sînge capilar vine în contact cu cca 2 l aer alveolar (capacitatea funcțională reziduală). În efort fizic, exceptînd membrana alveolo-capilară, care nu se modifică, ceilalți factori cresc cu 50%.

În condiții de repaus, circulația printr-un capilar pulmonar durează în medie 0,75 s. În sîngele venos, care vine la plămîn, P_{O_2} este de 40 mm Hg. În contact, prin membrana alveolo-capilară cu

aerul alveolar, în care P_{O_2} este de 100 mmHg, se realizează o saturație totală a hemoglobinei cu oxigen în 0,3 s.

Capacitatea de difuzie a plămînilor (D_L) măsoară valoarea de difuzie a oxigenului. Ea este definită ca și cantitatea totală de oxigen sau alt gaz, ce trece prin membrana alveolo-capilară pe minut și pe mm diferență de presiune, din aerul alveolar în sîngele capilar. Ea poate fi măsurată la om și valorile ei pentru oxigen ($D_{L_{O_2}}$) cresc proporțional în hipoxie și în efort fizic.

Bohr a pus problema măsurării capacității pulmonare de difuzie cu CO, ceea ce a fost realizat tehnic ulterior de Krogh. Valorile obținute sînt însă mari, deoarece CO are mare afinitate pentru hemoglobină. Creșterea patului capilar, cu deosebire la atleți duce la valori ridicate ale $D_{L_{CO}}$.

În final, difuzia gazelor prin membrana alveolo-capilară, proces fizic, poate fi exprimată în termenii ecuației lui Fick:

$$\frac{Q}{t} = DA \frac{C_1 - C_2}{d}$$

Q = cantitatea de substanță ce difuzează;

t = unitatea de timp;

D = coeficientul de difuziune al gazului dat;

A = suprafața de difuzie;

$C_1 - C_2$ = diferența de concentrație;

d = distanța.

Conform legii lui Fick, cantitatea de gaz ce difuzează în unitatea de timp este direct proporțională cu coeficientul său de difuzie, cu suprafața prin care difuzia are loc și cu diferența concentrațiilor și invers proporțională cu distanța de difuzie.

Procesul se desfășoară însă mult mai complicat în plămîn, mai ales decă se urmărește exprimarea sa cantitativă. În acest scop se utilizează noțiunea de capacitate de difuzie (D), introdusă în fiziologie de Bohr, și Krogh, făcîndu-se abstracție în condiții normale de ceilalți termeni cantitativi ai ecuației lui Fick, ei fiind analizați calitativ de la caz la caz:

$$D = \frac{VO_2}{P} = \frac{\text{ml } O_2}{\text{min} \times 1 \text{ mmHg}}$$

Factorii care condiționează capacitatea de difuzie a gazelor din alveole spre sîngele capilarelor pulmonare sînt:

- Distanța de difuzie;
- Prezența surfactantului pulmonar alveolar;
- Suprafața de schimb (suprafața totală alveolo-capilară);
- Componenta eritrocitară și hemoglobina.

Distanța de difuzie depinde de grosimea membranei alveolocapilare, care crește în edemul pulmonar și în pneumonoze, reprezentând un factor de restricție. Surfactantul pulmonar, strat lichid tensioactiv care reduce tensiunea superficială dintre parenchimul pulmonar și aer, are un rol considerabil în a menține alveolele deschise, împiedicându-se colabarea și asigurând astfel schimbul alveolocapilar de gaze. Surfactantul este secretat de pneumocitele de tip II, aflate în structura epiteliului alveolar în proporție de 60%, dar acoperind numai 4% din suprafața membranei de schimb. Pe lângă rolul principal secretor al surfactantului, ele mai asigură regenerarea epiteliului alveolar. Componentii tensioactivi principali ai surfactantului sînt fosfolipide și anume: dipalmitoil-lecitina, sfingomielina, fosfatidil-dimetiletanolamina.

O implicație majoră în homeostazia oxigenului, cu consecințe grave sub raport patologic, a lipsei stratului de surfactant se întîlnește în patologia noului născut. Plămînul fetal, fiind la naștere umplut cu lichid, expansiunea sa reclamă resorbția rapidă a lichidului și formarea stratului de surfactant, care să asigure respirația atmosferică. Dacă surfactanții obișnuiți din lichidul pulmonar fetal sînt inhibați prin surfactanți de altă natură, lichidul nu se resoarbe rapid la naștere, stratul protector nu se formează, alveolele tind să colabeze și se instalează un sindrom analog celui întîlnit la noul născut uman.

Există date experimentale care demonstrează că perturbări ale metabolismului celulelor epiteliale alveolare secretoare de surfactant (concentrații ridicate de CO_2 inspirat, acidemie, reducerea fluxului sanguin, hiperoxie, hipoxie) ar putea avea consecințe de ordin etiologic în modificarea tensiunii superficiale, producerea de atelec-tazii și edeme.

În alte situații patologice se poate realiza ca un mecanism patogenetic, compromiterea funcțională a învelișului alveolar, deplasarea sa în edemul pulmonar de pe suprafața membranei pe suprafața liberă a lichidului de edem, solvirea sa în lichide de spălare a plămînului și lezarea directă în infecții bacteriene.

Încercările de a reface stratul normal de surfactanți cu aerosoli, au fost mai puțin izbutite decît cele prin administrarea precursorilor, utilizați în sinteza sa de celulele epiteliale.

Shunturile anatomice pulmonare sînt canale prin care sîngele din inima dreaptă (ramuri ale arterei pulmonare) este condus înspre vena pulmonară, care se varsă în atriul stîng. Prin aceste scurtcircuite, sîngele venos pulmonar ocolește alveolele pulmonare. Ele se numesc shunturi adevărate. Tot shunturi adevărate sînt unele capilare ce corespund alveolelor colabate, întrucît și ele permit ames-

tecul sîngelui venos din artera pulmonară cu sîngele arterializat în alveolele aerate.

Circulația colaterală a plămînului provine din venele pulmonare sau din aortă (vasele tebesiene și venele bronșice). Ea irigă un țesut sau un organ dat, cum ar fi bronșiile pleurale etc. În acest fel și în condiții normale prin shunturi se drenează 3—5% din debitul cardiac, valoare stabilită prin măsurile efectuate cu O_2 . Ea este superioară debitului shunturilor anatomice, care este de sub 1% din totalul debitului cardiac. Diferența între cele două valori corespunde scurt-circuitelor fiziologice, fiind reprezentată de sîngele care irigă alveolele neventilate sau puțin ventilate. Cantitatea de sînge care circulă prin shunturi se măsoară prin calcul din concentrația oxigenului arterial (CO_2 art.), concentrația O_2 din amestecul sîngelui venos din atriul drept (CO_2 ven.) și O_2 de la extremitatea venoasă a capilarelor sanguine (CO_2 cap.).

$$\frac{QS}{Q} = \frac{CO_2 \text{ art} - CO_2 \text{ cap}}{CO_2 \text{ ven} - CO_2 \text{ cap}}$$

QS = volumul sîngelui shuntat;

Q = volumul total circulator/1 min.

$\frac{QS}{Q} \cdot 100$ = procentul debitului shuntat din debitul circulator.

O mică parte din sîngele care provine prin shunturi din circulația bronșică sau coronariană nu se oxigenează, așa încît procentul sîngelui arterializat în plămîn, care părăsește acest organ prin venele pulmonare este de 96%. Într-un efort fizic intens, cînd consumul de oxigen al organismului uman crește de 20 de ori și chiar peste (de la 250 ml O_2 /min la 5500 ml/min), se produce, prin mecanisme reflexe, creșterea debitului circulator de la 5000 ml/min în repaus, la peste 25 l/min. Și în asemenea situații de mărire a debitului circulator, cu toată reducerea timpului de circulație în capilarele alveolare, oxigenarea se face total.

Suprafața de schimb alveolo-capilară îndeplinește funcția prin raportul echilibrat al celor două procese fiziologice ventilație-perfuzie. Distribuția aerului inspirat în alveolele pulmonare nu este uniformă. În zonele periferice ale lobilor, mai bogate în țesut elastic, cu expansiuni respiratorii mai ample, primenirea aerului alveolar e mai vie, reducîndu-se cu apropierea de hil. În acest sens, sub raportul primenirii aerului alveolar și schimbului de gaze se poate vorbi de compartimente pulmonare rapide și lente. În condițiile sindromului obstructiv apar spații alveolare mai mult sau mai puțin extinse, cu reîmprospătare redusă, pînă la zero în cazul atelectazierii, a aerului alveolar.

Pe lângă ceilalți factori de membrană analizați, schimbul de gaze alveolo-capilar depinde de ventilația alveolelor și de perfuzia capilarelor pulmonare. Din cei 6 l ai debitului respirator pe minut, 2 l sînt ventilați exclusiv în spațiul mort neparticipînd la schimburile gazoase, restul de 4 l/min reprezintă respirația alveolară de repaus. Debitul circulator pulmonar este de 5 l/min în repaus. Raportul ventilației alveolare, perfuzia capilară $\frac{V}{Q} = \frac{4}{5} = 0,8$.

Valoarea de 0,8 a acestui raport exprimă schimbul gazos optim prin membrana alveolară. Oricum gravitația favorizează atît ventilația, cît mai ales perfuzia zonelor pulmonare declive (bazale), față de rest (vîrfuri), valoarea raportului coboară în zonele declive și devine supraunitară în zonele opuse. Scăderea raportului sub 0,8 înseamnă reducerea oxigenării și cedării CO_2 , care devin nule. Modificările raportului ventilație-perfuzie duc la insuficiența pulmonară din sindromul obstructiv.

Arterializarea sub 100% a sîngelui în plămîni se explică prin mecanisme care în parte au fost analizate, putînd fi grupate după cum urmează:

1. Scăderea difuziei prin membrana alveolo-capilară.
2. Amestecarea sîngelui arterializat în plămîn cu sînge venos, provenit din circulația bronșică sau coronariană, iar în cazuri patologice prin shunturi.
3. Modificări inadecvate ale raportului ventilație/perfuzie sanguină pulmonară, care, în condițiile ventilării reduse a unor alveole, pot fi compensate prin hiperventilarea altora.

TRANSPORTUL ȘI CEDAREA OXIGENULUI DE CĂTRE SÎNGE

Oxigenul, fixat pe sînge în urma difuziei din alveolele pulmonare, unde este menținut prin reglarea automată a ventilației pulmonare sub o presiune parțială în jur de 100 mmHg, este transportat sub formă de oxihemoglobină, prin circulația sîngelui, întreținută de inimă, spre totalitatea părților corpului.

În acest fel, în homeostazia oxigenului tisular, circulația deține cel puțin același rol ca și ventilația pulmono-alveolară și hemoglobina din eritrocite.

Pe lângă oxigenul fixat în plămîni pe hemoglobină, transportat sub această formă, în proporție de 97% spre țesuturi, 3% din oxigen se dizolvă în plasma sanguină și este transportat ca atare.

Cantitatea de oxigen dizolvată în apa aflată în sînge la P_{AO_2} de 95—100 mmHg și la pH 7,4 este de 0,29/100 ml. În capilare, la scăderea P_{O_2} la 40 mmHg, rămîne dizolvată o cantitate de 0,12 ml%, adică 0,17 ml este cedat țesuturilor. Oxigenul dizolvat este consumat astfel de celule, facilitînd disocierea O_2Hb și cedarea celor aproximativ 5 ml O_2 legați de hemoglobină din fiecare 100 ml sînge.

Dat fiindcă în sînge, în valoare medie se găsesc 15 g% hemoglobină și că fiecare gram de hemoglobină fixează și transportă 1,34 ml O_2 , înseamnă că fiecare 100 ml sînge arterializat conține în cifre rotunde 20 ml O_2 . Din această cantitate de oxigen în țesuturi este reținută numai o parte, în jur de 5 ml O_2 , restul regăsindu-se în sîngele venos.

În aceste condiții înseamnă că cei aproximativ 5000 ml sînge, cît reprezintă debitul cardiac cedează țesuturilor în timp de un minut în jur de 250 ml oxigen.

Coeficientul de utilizare a oxigenului sau coeficientul de extracție tisulară a O_2 reprezintă fracțiunea de hemoglobină care cedează oxigen la trecerea sa prin capilare și care este, în condiții normale în sîngele recoltat din inima dreaptă, 27%. Cu alte cuvinte 1/4 din

oxihemoglobină se reduce, $3/4$ revenind în sângele venos ca atare. În efort fizic intens și în alte condiții patologice, coeficientul de utilizare a O_2 poate crește la $77\%—80\%$, ceea ce reprezintă o valoare maximă pentru sângele venos mixt din circulația sistemică. Între diferitele teritorii circulatorii există însă diferențe însemnate. Astfel este cunoscut că în circulația coronariană, în condiții de repaus, coeficientul de utilizare a O_2 este de peste 60% . În acest mod, creșterea aportului de O_2 spre miocardul în activitate nu se poate realiza practic decât prin creșterea debitului coronarian.

În ultimul timp, numeroși cercetători și-au pus problema găsi-rii unor modalități prin care să activeze disocierea O_2Hb în circulația sa capilară și prin aceasta să mărească coeficientul de utilizare a oxigenului în diferite stări de hipoxie.

Este aceasta o cale care s-a dovedit de pe acum, în experiment, promițătoare pentru terapia unor variate forme de hipoxii.

Creșterea coeficientului de utilizare a oxigenului este determinată în condiții fiziologice de efectul Bohr, devierea pH-ului sanguin spre aciditate și creșterea temperaturii, condiții ce se realizează în toate țesuturile în activitate.

DEBITUL ARTERIAL DE OXIGEN

Transportul arterial de oxigen depinde de debitul circulator și de cantitatea de oxigen vehiculată pe unitatea de volum de sânge (concentrația arterială de O_2). Debitul arterial de O_2 se exprimă în ml/min.

$$Va_{O_2} = (Q \text{ l min}^{-1}) \times Ca_{O_2} \text{ ml l}^{-1}$$

În repaus valoarea sa este:

$$Va_{O_2} = 5 \times 200 = 1000 \text{ ml/min}$$

Debitul venos de O_2 este cantitatea de O_2 neconsumată de țesuturi, care revine la inimă în timp de 1 minut.

DEBITUL CARDIAC

Debitul cardiac reprezintă cantitatea de sânge expulzată într-un minut de inima dreaptă sau de inima stângă (minut-volum), aceste cantități fiind egale, sau cantitatea de sânge expulzată cu fiecare sistolă (debitul sistolic sau volumul-bătaie).

Măsurarea debitului cardiac se poate face pe baza principiului lui Fick. Se măsoară cantitatea totală de oxigen reținută în timp de 1 minut în plămîni (250 ml în repaus) și diferența concentrației oxigenului în sîngele arterial (180 ml‰) și venos (130 ml‰) egală cu 50 ml‰ oxigen, valoare care reprezintă cantitatea de O_2 fixat pe fiecare litru de sînge ce trece prin plămîn. Raportul între cantitatea totală de oxigen, utilizată în timp de 1 minut, și diferența arterio-venoasă a oxigenului reprezintă cantitatea de sînge care a trecut prin plămîni în timp de 1 minut.

$$D = \frac{\text{consum total } O_2}{\text{Dif. } A - V} = \frac{250}{50} = 5 \text{ l}$$

Bineînțeles, aceeași cantitate va trece în unitatea de timp prin inima dreaptă și prin inima stîngă. Raportînd cantitatea de sînge în ml, care trece prin inimă în timp de 1 minut, la numărul contracțiilor cardiace (70/min) se obține debitul bătaie sau volumul bătaie, egal cu 70 ml (60—85 ml).

Exprimarea cea mai corectă a debitului cardiac este în raport cu suprafața corporală, dată fiind relația dintre intensitatea proceselor metabolice și valoarea debitului cardiac. Exprimat în acest fel, la om la 1 m² suprafață corporală, debitul cardiac de repaus este de 3,2—3,5 l/min. Măsurarea se face din acest motiv în condiții bazale.

În condiții fiziologice, debitul cardiac crește caracteristic în cursul efortului fizic, proporțional cu intensitatea efortului și cu cantitatea de oxigen consumat.

De la cinci litri în repaus, debitul circulator poate să ajungă în efort intens la 22 litri, iar în efortul excesiv la 30—35 l/min. Diferența arterio-venoasă (coeficientul de utilizare) a oxigenului poate crește, de la 45—50 ml la 140 ml‰. Creșterea diferenței arterio-venoase a oxigenului asigură o protejare a inimii. Dacă într-un efort excesiv consumul de oxigen ajunge la 5000 ml/min, în timp ce în repaus era de 250 ml, raportînd acest consum la diferența arterio-venoasă care era de 50 în exemplul dat obținem un debit cardiac de 5 litri. În cursul efortului fizic, creșterea consumului de oxigen la 5000 ml în timp de 1 min, cu păstrarea aceleiași diferențe arterio-venoase de 50, ar necesita un debit cardiac de 80 litri, ceea ce este imposibil.

Creșterea coeficientului de utilizare a oxigenului către țesuturi în cursul efortului de la 27‰ la 80‰ face ca adaptarea inimii să se realizeze printr-o creștere a debitului cardiac, pînă la maximum 35 l/min. Creșterea coeficientului de utilizare a oxigenului

este posibilă în efort, în primul rând datorită efectului Bohr și acidozei, prin cataboliți care rezultă din activitatea musculară, în prezența cărora oxihemoglobina disociază mai rapid, punând o cantitate mai mare de oxigen la dispoziția țesuturilor. Disocierea O_2Hb este facilitată și de creșterea temperaturii.

La fel, creșterea consumului de oxigen în celulele active, creează o diferență mai exprimată a tensiunii oxigenului între acestea și sânge.

Un alt factor este creșterea volumului-bătăie. Astfel, la un subiect antrenat poate crește de la 91 ml în repaus, la 128 ml în efort. Creșterea nu poate însă să depășească 130—190 ml sânge, chiar la persoanele antrenate. O adaptare eficientă se realizează și prin creșterea optimă a frecvenței contracțiilor cardiace. Simultan crește ventilația pulmonară la valori de pînă la 20 față de normal.

Efortul fizic repetat duce la o adaptare de durată a inimii, care se manifestă prin hipertrofia miocardului. Hipertrofia inimii în condiții fiziologice se întâlnește la muncitorii care prestează eforturi fizice intense și la sportivi. Pentru a înțelege mecanismul hipertrofiei cordului este necesar să se știe că între capilarele sanguine, care irigă fibrele miocardice și aceste fibre, există un anumit raport numeric. La naștere la 1 capilar sanguin corespund 6 fibre miocardice. Mai târziu, cu vîrsta, acest raport se schimbă, în așa fel încît, după ce inima s-a dezvoltat, la adult, pentru fiecare capilar sanguin se observă aproximativ o fibră miocardică, deci raportul devine 1:1. De aceea la copil, capacitatea de adaptare a inimii la efort, din punct de vedere metabolic, este mai redusă.

În cazul unui efort fizic susținut, de durată, prin antrenament sportiv sau prin muncă fizică, se produce hipertrofia cordului. De la greutatea normală (300 g) inima de sportiv poate să ajungă la 500 g. Hipertrofia miocardului nu constă în creșterea numărului de fibre musculare cardiace, ci în creșterea diametrului acestor fibre.

Scăderea hematocritului, ca de exemplu în anemii, reduce proporțional capacitatea de transport a sîngelui pentru oxigen. Scăderea vîscozității sîngelui, din cauza reducerii eritrocitelor circulante, determină o creștere a debitului circulator, ca urmare a scăderii rezistenței de curgere, dar și aceasta, ca și alte reacții compensatorii, nu este în măsură să asigure transportul oxigenului la țesuturi.

Nici creșterea hematocritului, peste valori de 40—45%, nu este favorabilă transportului de oxigen, întrucît ea reduce debitul circulator, determinînd scăderea aportului de oxigen pe unitatea de timp.

În anumite situații normale și patologice, cantitatea de oxigen transportat la țesuturi poate crește de 15 ori, ceea ce înseamnă 3750 ml O_2 /min (15×250 ml). Prin antrenament fizic, această valoare poate fi ridicată pînă la 5 l/min, deci de 20 ori mai mult decît în condiții normale.

Cantitatea de oxigen transportată de sînge la țesuturi depinde și de presiunea atmosferică la care se găsește subiectul. Astfel, la altitudine, la o scădere a P_{O_2} alveolar la 60 mmHg, saturația hemoglobinei cu oxigen scade la 89%, deci numai cu 7%, față de valoarea normală, țesuturile fiind însă în măsură să rețină 5 ml oxigen din fiecare 100 ml sînge.

Procesul compensator se desfășoară în sens invers la creșterea P_{O_2} atmosferic, pînă la valori ce nu depășesc 500 mmHg P_{O_2} . În aceste condiții, homeostazia tisulară a oxigenului este menținută cu oscilații de cîtiva mmHg P_{O_2} .

CEDAREA OXIGENULUI ÎN ȚESUTURI. CIANOZA

Hipoxia tisulară apare la o P_{VO_2} inferioară valorii de 20—25 mmHg. La asemenea valori, P_{O_2} este mult prea scăzută pentru a se produce difuzia O_2 spre țesuturi, în timpul trecerii sîngelui prin capilare. La scăderi ale P_{O_2} capilare sub 15—20 mmHg, C_{VO_2} revine la o valoare de minimum 4 ml O_2 /100 ml sînge.

Cum V_{AO_2} depinde de debitul cardiac, de hematocrit, de hemoglobina activă (carboxihemoglobină, methemoglobină), de saturația cu O_2 a sîngelui și în unele hemoglobinopatii de afinitatea hemoglobinei pentru oxigen, scăderea unuia sau mai multora din acești factori reduce V_{AO_2} , determinînd hipoxie tisulară. Aceasta declanșează reacții compensatoare: creșterea debitului circulator, hiperventilație, alcaloză, mobilizarea eritrocitelor din depozite, secreție de eritropoetină și poliglobulie, creșterea 2—3 DPG eritrocitar, modificări ale activității enzimelor respiratorii celulare etc.

Cianoza este un important simptom clinic al hipoxiei tisulare. Colorarea albastru violacee a tegumentelor și a scleroticii apare cînd concentrația hemoglobinei reduse depășește, în sîngele arterial, 5 g Hb%, sau o nesaturare în O_2 a sîngelui de 6,7 ml%; e un semn clinic net pentru stările de desaturare avansată. Cianoza apare în două situații: stază capilară și desaturare progresivă (insuficiență cardiacă, șoc, poliglobulii) sau oxigenare insuficientă arterială (insuficiență respiratorie).

În afară de cantitatea absolută de hemoglobină redusă din sângele capilar, la apariția cianozelor contribuie vîscozitatea sîngelui, care, încetinind fluxul capilar, determină cedarea unei cantități mărite de O_2 din unitatea de volum de sînge și astfel creșterea cantității absolute de Hb peste 5 g%. Mai intervine pigmentarea pielii și grosimea ei.

Cianoza poate apare și ca urmare a unei reduceri a debitului circulator cutanat, în boli ale vaselor periferice.

În anemii, nu apare cianoză, din cauza creșterii fluxului circulator cutanat, ca urmare a scăderii vîscozității sîngelui. La fel, nu apare în intoxicațiile cu CO, căci carboxihemoglobina conferă sîngelui o culoare roșie.

Repartizarea debitului circulator total diferitelor sisteme de organe este inegală și are unele particularități legate de funcția lor, precum și de consumul de oxigen în condiții de repaus și de activitate.

Reproducem în tab. I. după W a d e și B i s h o p (1962), valorile de distribuire a debitului cardiac în repaus.

TABELUL I

REPARTIȚIA DEBITULUI CARDIAC ȘI A CONSUMULUI DE OXIGEN LA SUBIECTUL UMAN NORMAL* ÎN REPAUS (DUPĂ WADE ȘI BISHOP, 1962)

<i>Circulația</i>	<i>Debit sanguin</i>		<i>Diferența arterio-venoasă (vol. %)</i>	<i>Consum de oxigen</i>	
	<i>ml/min</i>	<i>% total</i>		<i>ml/min</i>	<i>% total</i>
Splanchnic	1400	24	4,1	58	25
Renal	1100	19	1,3	16	7
Cerebral	750	13	6,3	46	20
Coronarian	250	4	11,4	27	11
Mușchi scheletici	1200	21	8,0	70	30
Piele	500	9	1,0	5	2
Alte organe	600	10	3,0	12	5
	5800	100	4,0	234	100

* 70 kg, suprafață 1,7 m²

Debitele circulatorii regionale depind de o serie de factori. În primul rând, debitul local al unui organ sau țesut este direct proporțional cu presiunea arterială și invers proporțional cu rezistența arteriolară. Valoarea acestor parametri poate fi influențată de tonusul vasomotor de bază de natură miogenă și simpatoadrenală, de către factori locali metabolici și endocrini cu acțiune modificatoare asupra tonusului de bază și prin mecanisme vasomotorii nervoase extrinsece. Prin aceste efecte asupra tonusului de bază, circulația și debitul de oxigen se adaptează nevoilor metabolice. Reproducem în tabelul II. (Mellander și Johansson, 1968). valorile debitelor circulatorii de bază (Q_b), maximele (Q_m) și tonusul bazal al diferitelor organe.

TABELUL II

DEBITUL BAZAL Q_b , DEBITUL MAXIMAL Q_m ȘI TONUSUL BAZAL R_b/R_{vd} ÎN DIFERITE ORGANE ÎN STADIUL BAZAL ȘI ÎN TIMPUL VASODILATATIEI MAXIME (DUPĂ S. MELLANDER ȘI B. JOHANSSON, 1968)

	Q_b (l. min ⁻¹)	Q_{max} (l. min ⁻¹)	R_b/R_{vd}
Mușchi scheletic	0,8	18,0	24
Piele	0,2	3,5	17
Glandele salivare	0,02	0,25	13
Tub digestiv	0,7	5,5	7,9
Ficat (arteră hepatică)	0,5	3,0	6,1
Miocard	0,2	1,2	5,8
Țesut adipos	0,8	3,0	3,8
Sistem nervos central	0,8	2,1	2,8
Rinichi	1,2	1,4	1,2

Debitele sînt calculate pentru un bărbat de 70 kg.

FIXAREA OXIGENULUI PE HEMOGLOBINA

Sîngele de mamifer poate fixa și transporta sub formă dizolvată, deci printr-un proces pur fizic, o cantitate de numai 0,3 ml O_2 %. Cea mai mare parte a oxigenului se fixează însă pe sînge prin combinare cu hemoglobina, în așa fel că 100 ml sînge arterial oxigenat în plămîni conține 20 ml O_2 .

HEMOGLOBINA

Este o cromoproteidă tetramerică formată din patru lanțuri polipeptidice. Fiecare lanț este fixat prin legături covalente cu un atom de fier, situat în centrul unui nucleu tetrapirolic, cu care Fe formează hemul, gruparea prostetică. Cele patru lanțuri polipeptidice separate formează globina, aceasta fiind în realitate alcătuită din patru subunități polipeptidice și patru nuclee de hem. Atomul de fier are rol funcțional important în fixarea O_2 , conferindu-i hemoglobinei funcția de proteină transportoare a oxigenului și bioxidului de carbon.

Hemoglobina se comportă ca o protein-enzimă alosterică, molecula sa dispunînd de mai mulți receptori specifici. Pe aceștia se fixează anumiți liganzi, în raport de concentrația lor în mediu: O_2 , CO_2 , H^+ , ATP, 2—3 DPG. Fixîndu-se pe receptori adecvați, ei acționează ca efectori alosterici, care modifică conformația moleculei și reactivitatea sa pentru ceilalți liganți, în primul rînd pentru O_2 și CO_2 .

Molecula hemoglobinei este aproape sferică, cu diametru de 6 nm și o greutate moleculară de 64 500. Configurația moleculară a hemoglobinei e bine cunoscută. Hemoglobina A conține două unități

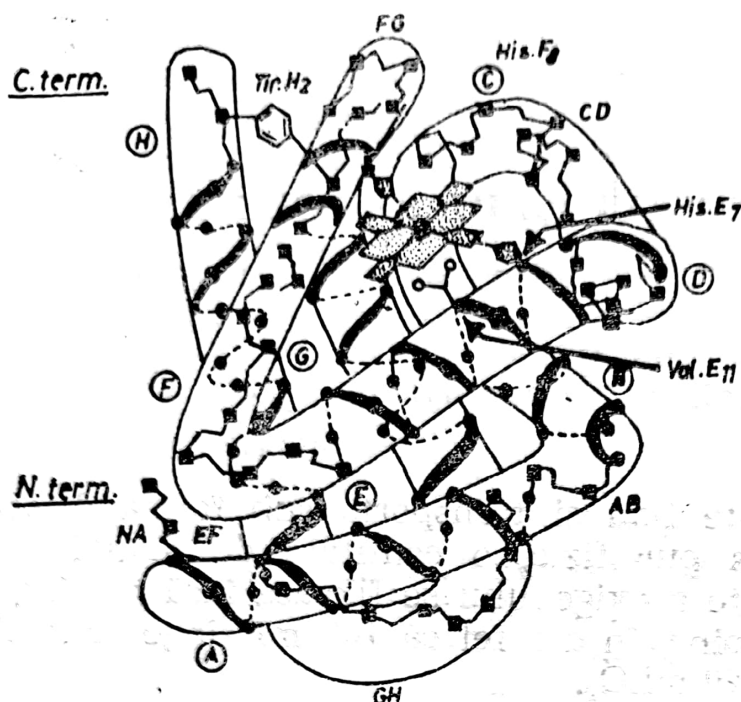


Fig. 6a. Lanțul β al hemoglobinei.

α peptidice și două unități β . Lanțul alfa este alcătuit din 141 resturi de acizi aminați, iar lanțul beta din 146 resturi.

Analiza structurii terțiare a hemoglobinei arată că atomii de Fe sînt conținuți într-o cavitate a porțiunilor nepolare ale secvenței de acizi aminați, cu alte cuvinte într-un mediu hidrofob. Una din aceste cavități ale celor patru lanțuri adăpostește butonul tirozinic de presiune (tirozina care precedă imediat extremitatea C terminală a lanțului polipeptidic) și hemul, bine

fixat prin forțe Van der Waals.

Poziția fierului joacă un rol important în funcționarea moleculei de hemoglobină. În starea dezoxigenată sau redusă a hemoglobinei se stabilesc patru legături coordinative ale fierului cu cei patru N din nucleul tetrapirolic și o legătură covalentă solidă cu N

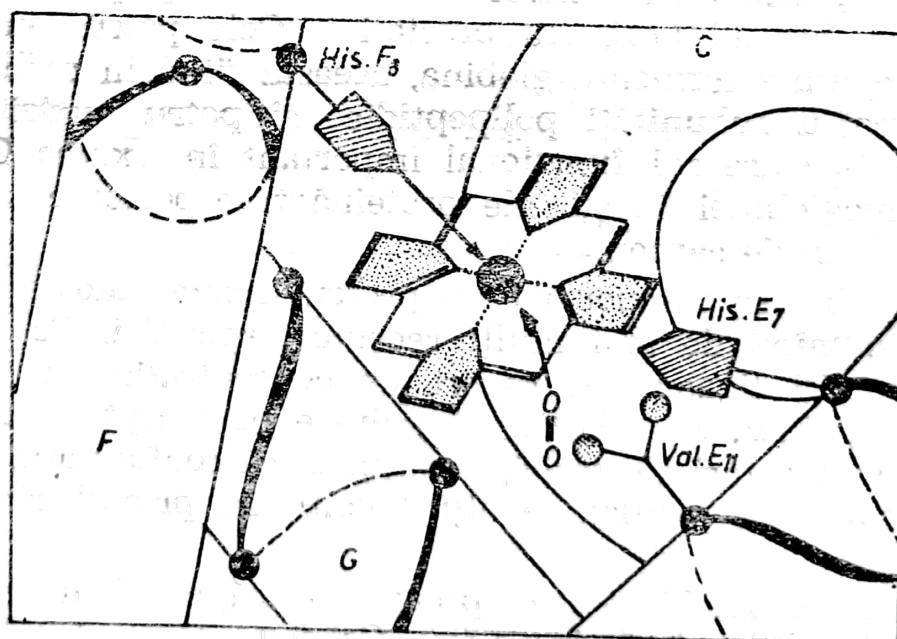


Fig. 6.b. Cavitata hemului.

nucleului imidazolic al histidinei F_8 . În această stare spinul electronic este ridicat, diametrul atomului depășește spațiul central al nucleului tetrapirolic, suferind o retragere din planul hemului.

Fixarea unui ligand O_2 pe a șasea valență a fierului reduce spinul electronic, precum și diametrul acestuia, atomul de Fe revenind în planul nucleului tetrapirolic, provocând și alte modificări de configurație.

Cum între lanțurile polipeptidice, în structura cuaternară a hemoglobinei există punți de legături puțin stabile în raport de aceasta, restul lanțurilor fiind mobile, hemoglobina se găsește sub două forme: dezoxigenată sau contractată și oxigenată sau relaxată. Trecură de la o formă la alta se numește tranziție alosterică.

Fără a intra în detalii de biochimie și fiziologie celulară, este de precizat că prin conformație și proprietățile ce derivă din aceasta, molecula de hemoglobină se comportă ca un ordinator molecular, care recepționează, decodifică și depozitează diferite semnale biologice, de intensitate minimă la scară de mișcări electronice și le transformă în funcție de programul înscris în molecula sa, în modificări conformaționale prin care este facilitat sau inhibat accesul O_2 , CO_2 sau 2—3 DPG în cavitățile moleculare în care se fixează. Astfel, la presiuni mici ale O_2 el este fixat numai pe lanțurile α , proces care facilitează la rându-i, peste P_{O_2} de 30 mm, fixarea în măsură egală pe toate lanțurile.

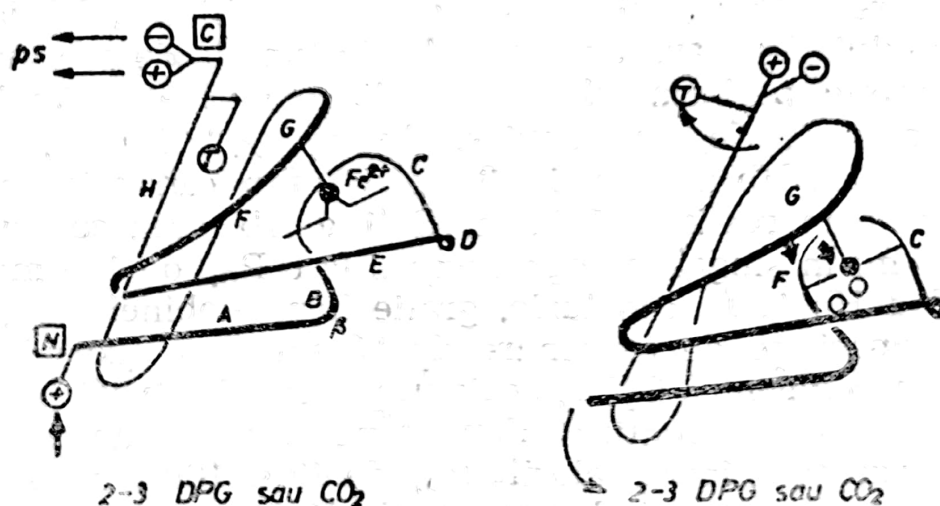


Fig. 7. Fenomenul de tranziție alosterică a hemoglobinei, în urma fixării oxigenului. Atomul de Fe^{2+} , legându-se la O_2 , raza sa diminuează și se poate așeza în planul hemului, atrăgând helixul F, care deplasează helixul G. Rezultă o deformare a cavității tirozinei (T) care este ejectată, o ruptură a punților saline (ps) intercatenare cu respingerea H^+ (efect Bohr) și o ruptură a legăturilor N-terminale cu 2—3 DPG-ul sau cu CO_2 -ul (liza carbamatului), cu captarea H^+ (efectul anti-Bohr).

Tranziția alosterică a moleculei de hemoglobină, la care participă lanțurile polipeptidice din structura sa, explică afinitatea și capacitatea diferitelor tipuri de hemoglobină pentru oxigen, cum ar fi afinitatea mărită a hemoglobinei F și cea mult redusă a unora din hemoglobinele patologice, cu tulburări consecutive ale transportului de oxigen.

Astfel P_{50} , adică P_{O_2} , la care 50% din hemoglobină se saturează cu oxigen, are la om valoarea de $26,5 \text{ mmHg} \pm 1$ pentru hemoglobina A și 16 mmHg pentru hemoglobina fetală. Pentru mioglobină, similară ca structură cu hemoglobina, dar avînd rol de depozit de O_2 , cu o conformație moleculară asupra căreia liganzii n-au nici un efect, P_{50} este de 10 mmHg .

CURBA DE DISOCIERE A OXIHEMOGLOBINEI (CDO)

Exprimă grafic relația P_{O_2}/O_2 fixat pe hemoglobină, avînd aspect sigmoid. Forma graficului, diferită sub acțiunea liganzilor cît și pentru variatele forme de hemoglobină, este rezultatul cooperativității între lanțurile polipeptidice cu alosteria consecutivă, precum și al interacțiunilor hem-hem. Astfel, dacă artificial hemul este cuplat cu o altă proteină sau cu globine cu secvența acizilor aminați modificată, proprietatea fierului de a fixa oxigenul se modifică profund.

Oxigenarea hemoglobinei este o reacție chimică labilă a O_2 cu fierul hemului. Are caracter reversibil în funcție de presiunea oxigenului. Teoretic, pe baza calculelor stoichiometrice, un mol Hb, conținînd 4 moli de Fe, ar trebui să fixeze $4 \times 22,4 \text{ l } O_2$, condiție în care pentru 1 g Hb ar reveni $1,38 \text{ ml } O_2$. Dar cantitatea maximă de O_2 fixat este în realitate $1,34 \text{ ml } O_2/1 \text{ g Hb}$, ceea ce revine la $20 \text{ ml } O_2/100 \text{ ml}$ în sîngele integral expus la o P_{O_2} de 100 mmHg , conținînd $15 \text{ g Hb}\%$. În concluzie, grație hemoglobinei, sîngele uman, avînd o capacitate de oxigenare de $20 \text{ ml } O_2\%$, fixează de 70 de ori mai mult oxigen ca $O_2\text{Hb}$, decît sub formă dizolvată ($20 : 0,3 = 70$).

Analiza CDO evidențiază două zone diferite ale acesteia: una aproape orizontală, între valorile P_{O_2} de 40 și 100 mmHg și alta sub P_{O_2} de 40 mmHg , care tinde spre verticală.

Semnificația funcțională a acestor două segmente, cel superior corespunzînd oxigenării sîngelui, iar cel inferior cedării oxigenului în zona țesuturilor, este primordială. Astfel, primul segment superior al curbei arată că oxigenarea Hb se face încă în proporție de 80% la scăderea P_{O_2} pînă la 50 mmHg (altitudine de 4500 m)

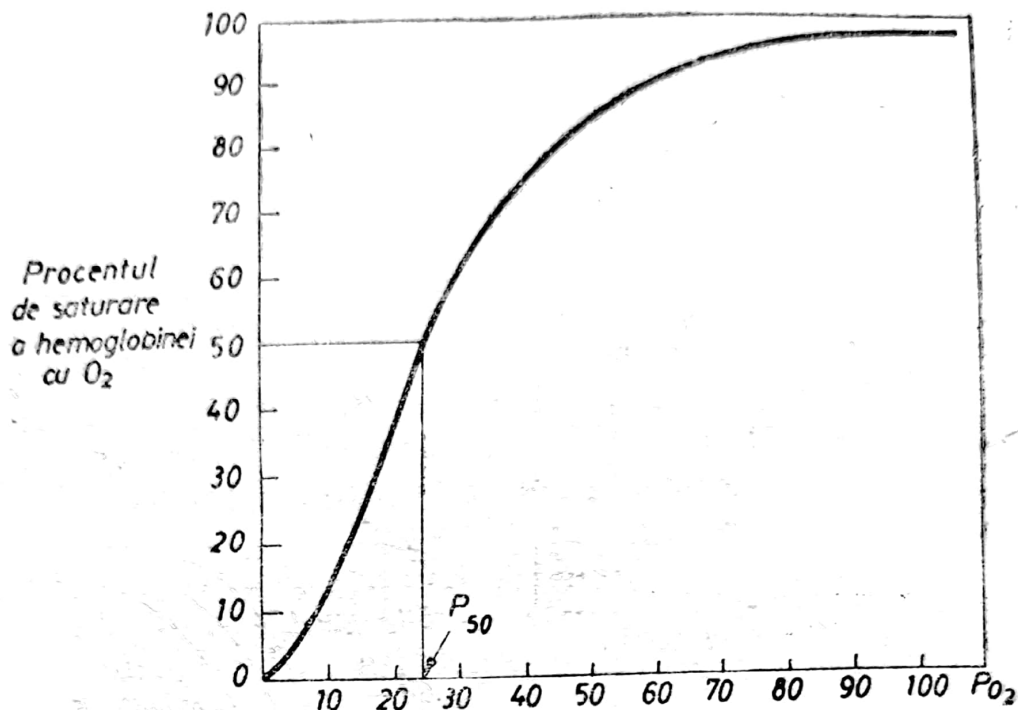


Fig. 8. Curba de disociere a oxihemoglobinei.

sau în cazul reducerii ventilației alveolare cu 50%. Astfel măsurarea presiunii alveolare a oxigenului (P_{aO_2}) este un test funcțional mai sensibil decât măsurarea gradului de saturație cu oxigen a sîngelui (SaO_2).

Curba de disociere a O_2Hb la presiuni mici, prin forma sa apropiată de verticală, este favorabilă dezoxigenării O_2Hb și cedării O_2 celulelor la P_{O_2} tisulare foarte coborîte, ceea ce permite compensarea hipoxiilor foarte avansate. Astfel P_{O_2} în sîngele venos de la valori de 40 mmHg în condiții normale poate scădea la 20—30 mmHg și prin aceasta oxigenul cedat de O_2Hb crește de două-trei ori.

EFECTELE pH, AL PCO_2 , ALE TEMPERATURII ȘI ALE 2—3 DPG ASUPRA CONFORMĂȚIEI MOLECULARE A Hb ȘI A CDO

Transportul O_2 pe Hb poate fi influențat în urma modificării conformației sale moleculare sub acțiunea liganților, care se comportă ca efectori alosterici. Ca urmare a efectului lor, CDO se poate deplasa spre dreapta sau spre stînga.

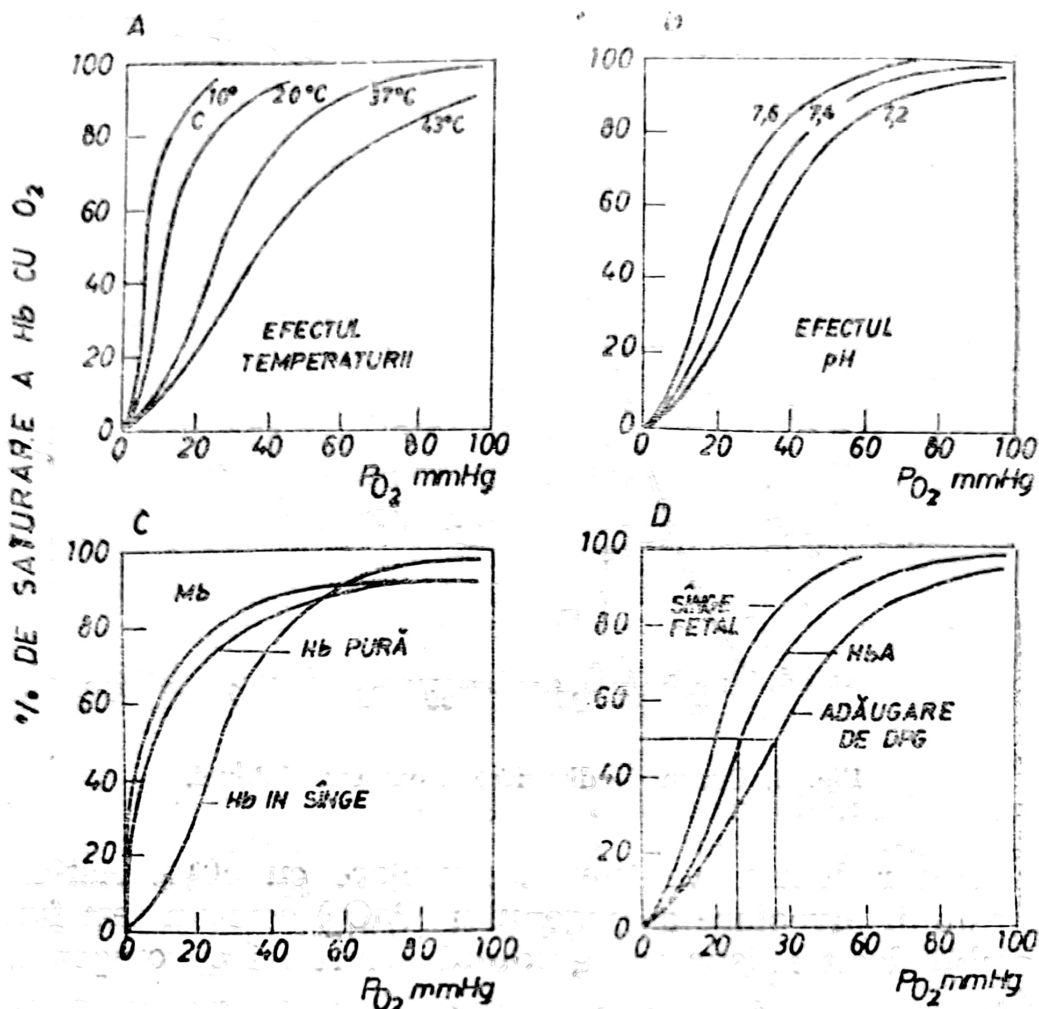


Fig. 9. Variațiile curbei de disociere a oxihemoglobinei (HbO_2).

A. Efectul variației temperaturii;

B. Efectul variației pH-ului sanguin;

C. Curba hiperbolică a hemoglobinei A „purificată” (dializată pentru a fi debarasată de săruri).

D. Curba de disociere a sîngelui fetal (dar nu a HbF pure) este situată la stînga față de aceea a sîngelui adult, care conține HbA ; adîția difosfogliceratului (DPG) deplasează spre dreapta curba sîngelui încărcat cu HbA și mărește P_{50} (adică scade afinitatea O_2 pentru Hb și facilitează eliberarea O_2 în țesuturi).

Acțiunea pH-ului eritrocitar a fost descrisă înainte de cunoașterea conformației moleculare a hemoglobinei sub denumirea de „efectul Bohr”. În termeni de biologie moleculară, efectul Bohr se definește ca fiind reducerea afinității hemoglobinei pentru O_2 datorită acidozei (H^+), care mărește P_{50} , prin consolidarea punților saline și deci a formei contractate a moleculei. Alcaloza are efect invers. Fixarea și eliberarea H^+ se face pe anumite grupări imidazol și guanidinice ale unor acizi aminați slabi, iar efectul Bohr se datorește în cea mai mare parte mișcărilor H^+ pe histidina din poziția

146 a lanțului β . Valoarea efectului Bohr poate fi calculată pentru toate valorile pH, după formula:

$$\Sigma = \Delta \log \cdot P_{50} / \Delta \text{pH}$$

Cum P_{50} la pH 7,4 = 26,5 mmHg, iar $\log 26,5 = 1,42$

$$\log P_{50} = 1,42 + \Sigma \Delta \cdot \text{pH}$$

Prezența CO_2 amplifică efectul Bohr acid.

Efectul Bohr are o mare importanță fiziologică. Metaboliții celulari acizi, și în primul rând CO_3H_2 , prin acest efect, facilitează dezoxigenarea O_2Hb la valori ridicate ale P_{O_2} . Oxigenul eliberat intervine la rîndu-i în tamponarea H^+ ionilor. Efectul este invers în plămîni unde pH-ul alcalin facilitează fixarea O_2 pe Hb. Pentru ilustrare se poate da exemplul oxigenării hemoglobinei la 35 mmHg în proporție de 67% la pH 7,4 și numai de 45% la pH 7,1. În primul caz, alcaloza asigură o oxigenare pulmonară satisfăcătoare, pe cînd, în al doilea, acidoza asigură o oxigenare a sîngelui abia compatibilă cu viața.

Efectul temperaturii asupra CDO se manifestă în zona fiziologică prin creșterea P_{50} cu 1—1,5 Torr pentru fiecare grad de temperatură, facilitînd astfel disocierea O_2Hb în țesuturile active. În hipotermia provocată, la 18°C, cînd pH-ul crește la 7,70, P_{50} scade la 100 mmHg.

Efectul CO_2 asupra CDO constă în deplasarea curbei spre dreapta, datorită formării CO_3H_2 cu scăderea pH (efect Bohr) și printr-un efect specific — provocat prin fixarea CO_2 pe grupele aminice sub formă de carbamați, care stabilizează dezoxihemoglobina și facilitează transportul CO_2 de la țesuturi la plămîni în cantități importante (cca 50% din CO_2 expirat).

Efectul 2—3 DPG asupra CDO. Produs de metabolismul glicolitic al eritrocitelor, 2—3 DPG se formează exclusiv în aceste celule sub acțiunea enzimei DPG-mutaza. Se găsește în concentrație echimoleculară cu Hb, de patru ori mai mare decît a ATP. Este nedifuzibil, comportîndu-se ca un anion.

Ca efecte în interacțiunea cu Hb, reduce afinitatea acesteia pentru oxigen scăzînd pH-ul intraeritocitar (1/3 din efectul său) și fixîndu-se pe cavitatea centrală electropozitivă a lanțurilor β ale dezoxihemoglobinei. Nu se fixează pe structura R, deci pe O_2Hb , nici pe lanțurile γ ale HbF. 2—3 DPG acționează asupra structurii C a Hb, prin consolidarea legăturii inter β și deprimă formarea carbamaților cît și efectul anti-Bohr al CO_2 , deci 2—3 DPG activează efectul Bohr, în așa fel că efectul P_{CO_2} se dublează în prezența 2—3 DPG, comparativ cu absența sa. ATP are un efect mai redus, iar

ceilalți fosfați organici și anorganici, mai puțin ionizabili nu au nici un rol.

Sinteza 2—3 DPG crește în alcaloză, producând desaturarea și reducerea concentrației de hemoglobină. În acidoza acută, deplasarea CDO spre dreapta, prin efect Bohr și prin reducerea fixării CO_2 sub formă carbaminică, produce în timp de câteva ore o reducere a sintezei 2—3 DPG, care tinde să readucă spre stînga CDO.

Deplasarea spre stînga sau spre dreapta a curbei de disociere a oxihemoglobinei (CDO) are implicații funcționale. Deplasarea spre stînga mărește captarea de oxigen, iar spre dreapta facilitează cedarea O_2 , către țesuturi la P_{O_2} tisular ridicat, chiar dacă P_{O_2} alveolar este scăzută.

În condiții fiziologice, în efort fizic intens, cataboliții acizi, creșterea temperaturii țesuturilor în activitate, apariția 2—3 DPG deplasează în curs de o oră CDO spre dreapta, distribuind mai mult O_2 prin disocierea O_2Hb la o presiune superioară.

La altitudine, alcaloza respiratorie activează sinteza de 2—3 DPG prin mecanism adaptativ. P_{50} crește cu 2—5 Torr în 24 ore. Mai eficace sînt însă răspunsurile reflexe rapide la hipoxia hipoxică: hiperventilația, activarea circulației și creșterea progresivă a hemo-

globinei în primul timp, prin lansarea eritrocitelor din depozite, apoi prin activarea eritropoezei.

În o serie de hemoglobinopatii genetice, CDO este diferită de cea normală a adultului (fig. 10). Ele sînt compensate prin poliglobulie, cînd deviația este spre stînga, sau prin anemie la deviații spre dreapta a CDO.

Hemoglobina oxigenată, conținută în eritrocite este transportorul oxigenului pe calea singelui. În cursul evoluției, metaloproteinele fixatoare de oxigen au apărut inițial la never-

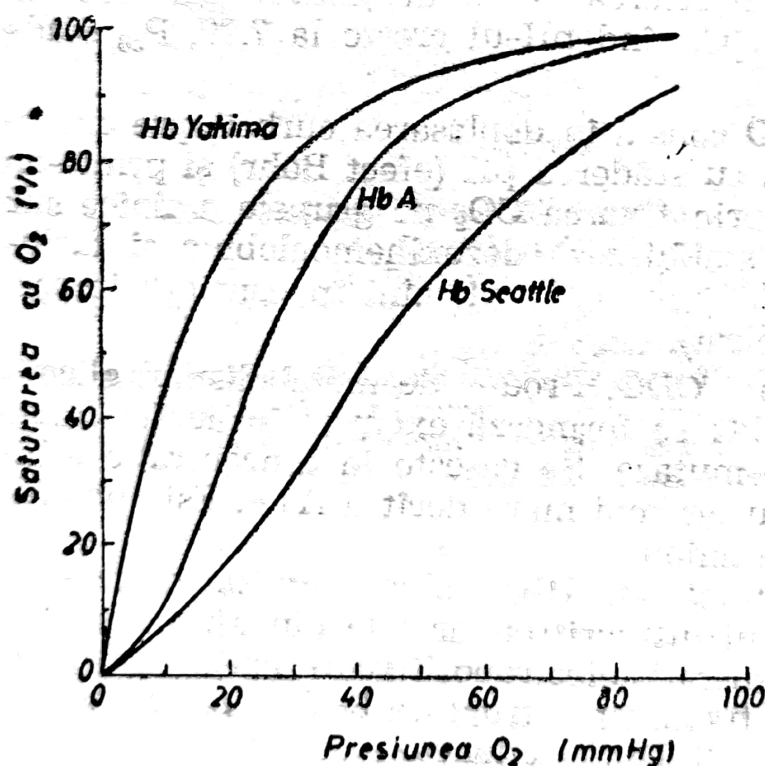


Fig. 10. Curbele de disociere a unor hemoglobine patologice cu afinitate mărită (Hb Yakima) sau micșorată (Hb Seattle), comparativ cu aceea a hemoglobinei normale.

tebrate în hemolimfă (hemeritina, hemocianina) și hemoglobina la vertebratele primitive. Includerea hemoglobinei în structuri celulare, în eritrocite, care suferă și ele un proces evolutiv de la forma ovoidală nucleată (pești, amfibii, reptile, păsări), la una de disc biconcav anucleată, la mamifere, reprezintă la fel un proces adaptativ, în sensul că creșterea capacității de fixare a oxigenului, prin realizarea de mari concentrații intraeritrocitare, se face

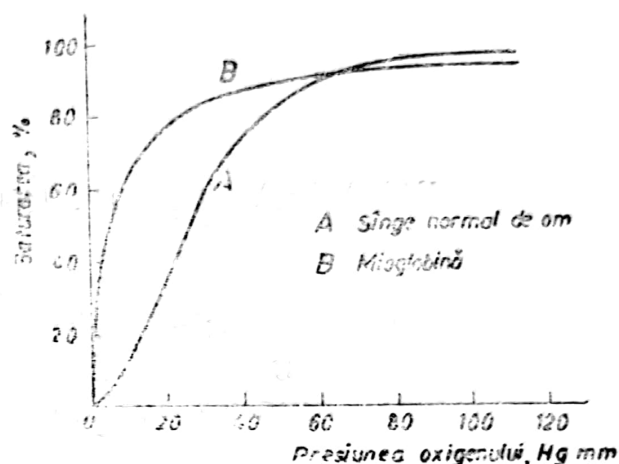


Fig. 11. Curba de disociere a mioglobinei (B), comparativ cu sânge normal de om (A).

cu o creștere mai mică a vîscozității sîngelui care ar reprezenta un impediment, pentru circulație. Astfel, dacă hemoglobina ar fi liberă la om, proteinele plasmatică ar crește cu 15 g%, și ca urmare și presiunea coloidosmotică a sîngelui. Forma de disc biconcav a hematiilor le conferă o suprafață mare în raport cu volumul, reducînd distanța intraeritocitară de difuzie a O_2 .

În sfîrșit, intraeritocitar Fe poate fi menținut bivalent datorită acțiunii sistemului furnizor de energie localizat aici, care funcționează metabolizînd glucoza pe calea pentozelor, realizînd astfel transportul de electroni.

Mărimea dimensiunilor eritrocitelor depinde de diametrul capilarelor, în general fiind proporțional cu atît mai mici, cu cît speciile sînt mai recente.

Funcția mioglobinei. Mioglobina se găsește în cantități ridicate în mușchii cu intensă capacitate oxidativă, care poate fi exprimată în activitatea citocromoxidazei, cu care este în raport direct proporțional. La fel, concentrații ridicate de mioglobină au fost evidențiate în mușchii animalelor scufundătoare. Aceștia au o capacitate ridicată (peste 10% vol. O_2) de legare a oxigenului. Irving și Scholander au descris dezoxigenarea completă a mioglobinei după cufundări de 5—10 min. ale fociei. Mioglobina are deci un efect de depozitare a O_2 , acționînd ca un rezervor care, atunci cînd aportul sanguin de O_2 devine critic, disociază. Pentru o asemenea funcție pledează aspectul curbei de disociere a mioglobinei (Fig. 11).

FIXAREA CO₂ PE SÎNGE — SISTEME TAMPON

În capilarele sanguine, prin pereții acestora cu o grosime de fracțiuni de micron, are loc difuzia oxigenului dinspre sînge spre țesuturi. Aici, ca urmare a consumului său continuu în celule, presiunea sa parțială se menține scăzută. Schimbul de oxigen sînge-celule se realizează conex cu formarea proporțională de bioxid de carbon rezultat în urma oxidațiilor celulare. El va difuza în sens invers, datorită gradientului de concentrație. Cantitatea de CO₂ produsă prin oxidarea substanțelor organice într-un organism uman adult este de cca 200 ml, sau 10 mM/1 min. El este transportat de la totalitatea celulelor pe calea sîngelui la plămîn, unde este eliminat. În 24 ore, se elimină, prin aerul expirat, 10.000—14.000 mM, deci tot atîți mEq H⁺, pe cînd rinichii unui subiect sănătos elimină doar 40—80 mEq, sub formă de acizi nevolatili. În procesul fixării pe sînge a CO₂, substanța care generează acidul carbonic, intervin ca un mecanism esențial sistemele tampon $\frac{HbH}{HbB}$ și $\frac{[CO_3H_2]}{[CO_3H^-]}$ menținînd constanța pH-ului sanguin. Abordarea studiului schimbului capilar al O₂ nu se poate face decît corelat cu schimbul de CO₂ și cu intervenția principalelor două sisteme tampon, cel eritrocitar, reprezentat prin hemoglobină/hemoglobinat, și cel plasmatic, prin acid carbonic/bicarbonat.

În eritrocite, oxihemoglobina, substanță acidă, se găsește în combinație cu K⁺. Prin pierderea oxigenului, în urma disocierii, hemoglobina rezultată devine un acid mai slab. Potasiul este cedat și neutralizarea sa este asigurată de ionii de Cl⁻, care provin din plasmă, prin disocierea ClNa; membrana eritrocitelor fiind permeabilă pentru anionul Cl⁻. Sodiul, pentru care această membrană este impermeabilă este reținut în plasmă.

Bioxidul de carbon rezultat din oxidațiile celulare, difuzînd în lichidul interstițial → plasmă → și de aici în eritrocite, în prezența anhidrazei carbonice, se combină, cu apa pentru a genera CO₃H₂.

Acesta disociază în CO_3H^- și H^+ . Prin cantitatea lor însemnată ionii H^+ eliberați ar putea modifica însemnat pH-ul sîngelui. Ei substituie însă K^+ în hemoglobina redusă, iar anionul CO_3H^- , difuzînd din eritrocit în plasmă, generează cu Na^+ CO_3HNa .

În felul acesta, CO_3H_2 , prin intervenția tamponului de hemoglobină intraeritocitar, generează un acid mult mai slab, care disociază foarte puțin — hemoglobina acidă — și o substanță bazică, constituent al principalului sistem tampon din plasmă, bicarbonatul de sodiu. Prin aceste reacții, cunoscute și sub denumirea de fenomenul de membrană al lui Hamburger, se asigură homeostazia concentrației H^+ ionilor în sîngele venos. Ca urmare, pH sanguin se menține la valoarea de 7,35, față de pH 7,40 al sîngelui arterial.

Tamponul de acid carbonic/bicarbonat de sodiu este atît de important în menținerea reacției sanguine, încît în funcție de raportul celor doi constituenți ai săi (bicarbonat/acid carbonic) se poate calcula valoarea pH-ului sanguin, așa cum au arătat Henderson și Hasselbalch. Acest raport, exprimat cantitativ pentru plasma sîngelui arterial, este $\frac{\text{CO}_3\text{H}^-}{\text{CO}_3\text{H}_2} = \frac{1}{20}$.

Intrucît pK' , adică logaritmul constantei de disociere al sistemului bicarbonat-acid carbonic este 6,1, utilizînd ecuația lui Henderson și Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}' + \log \frac{\text{HCO}_3^-}{\text{CO}_3\text{H}_2}$$

se poate scrie:

$$\text{pH} = 6,10 + \log 20 = 6,10 + 1,30 = 7,40$$

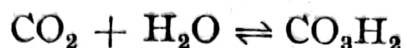
Este de subliniat că bioxidul de carbon se găsește în plasmă sub trei forme: ca atare, în stare dizolvată combinat cu apa, deci în stare hidratată ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$) și sub formă de anion bicarbonic, CO_3H^- , ca bicarbonat de sodiu.

CO_2 dizolvat în plasma sanguină este proporțional cantitativ cu presiunea parțială a acestui gaz în faza de vapori, cu care plasma este în echilibru. Intrucît plasma sîngelui arterial se găsește în echilibru cu presiunea parțială a CO_2 din aerul alveolar, a cărei constantă de 40 mmHg este menținută prin ventilația pulmonară, P_{CO_2} în sîngele arterial va avea aceeași valoare de presiune și anume 40 mmHg (Torr). Dat fiindcă, exprimat în concentrație molară, CO_2 dizolvat în plasmă este proporțional cu presiunea parțială a CO_2 plasmatic, se poate deduce din valoarea presiunii concentrația CO_2 dizolvat, în mmol/l:

$$[\text{CO}_2]_{\text{dis}} = 0,03 \text{ P}_{\text{CO}_2}$$

Dacă P_{CO_2} în aerul alveolar este 40 mmHg, atunci $P_{CO_2} = 0,03 \times 40 = 1,2$ mmol/l. Aceasta este valoarea pentru plasma arterială, în cea venoasă concentrația fiind mai ridicată.

O parte din CO_2 dizolvat în mediul apos al plasmei se hidratează generînd acid carbonic:



Reacția este reversibilă și se caracterizează prin cantitatea extrem de redusă a CO_3H_2 format. Astfel, la $37^\circ C$, la 500 molecule de CO_2 , apare o singură moleculă CO_3H_2 . Deoarece P_{CO_2} în sînge este proporțională atît cu H_2CO_3 cît și cu $[CO_2]$ dizolvat, dată fiind cantitatea extrem de redusă a CO_3H_2 (numai 0.002% față de totalul $[CO_2]$ dis.); se poate face abstracție de valoarea acestuia. Dacă reacția de hidratare a CO_2 este minimă și lentă, în sens invers dehidratarea CO_3H_2 este o reacție masivă și rapidă. Reacția reversibilă este catalizată în țesuturi și eritrocite de către anhidraza carbonică, nu însă și în plasmă.

Acidul carbonic format disociază rapid în anionul bicarbonic și H^+ :



La $38^\circ C$, disocierea sa este aproape completă. Dacă se măsoară însă în plasmă, concentrația ionilor de hidrogen $[H^+]$ este numai de 4×10^{-8} mol/litru, adică de 40 nmol/litru, pe cînd cea a ionilor de bicarbonat (CO_3H^-) este de 24 mmol/l.

Concentrația foarte redusă de ioni de H^+ în lichidul extracelular se explică prin posibilitățile multiple ale organismului de a elimina acești ioni în exterior, reținînd, în schimbul lor, ionii de Na^+ , care neutralizînd anionul bicarbonic, CO_3H^- , participă la menținerea pH-ului sanguin. Concentrația sa în plasmă este de fapt foarte ridicată, de 145 mEq/l (față de 0.00004 mEq/l a H^+).

Ecuatia de echilibru a CO_3H_2 :

$$K_{CO_3H_2} = \frac{[H^+][CO_3H^-]}{[CO_3H_2]}$$

poate fi scrisă sub această formă:

$$K_{CO_3H_2} = 1,6 \times 10^{-4} = \frac{[H^+][CO_3H^-]}{0,03 \cdot P_{CO_2}}$$

Din această ecuație dacă sînt cunoscute două valori, $[H^+]$, $[CO_3H^-]$ și P_{CO_2} , poate fi calculată cea de a treia valoare necunoscută.

Revenind la formula lui Henderson și Hasselbalch se poate înțelege mai bine de ce aceasta poate fi scrisă, ținând seama de formele și proporțiile CO_2 și CO_3H^- din sânge, la 38°C , înlocuind CO_3H_2 , care nu poate fi măsurat direct în valori molare, prin valoarea sa în Torr (mmHg), dată în mod practic de P_{CO_2} , care poate fi măsurată.

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{[\text{CO}_3\text{H}^-]}{0,03 \times P_{\text{CO}_2}}$$

CO_3H^- plasmatic reprezintă CO_2 sanguin total, minus CO_2 dizolvat în plasma sanguină, așa încât formula în care valorile sînt exprimate în mmol/l devine:

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{[\text{CO}_2 \text{ total}] - P_{\text{CO}_2} \times 0,03}{P_{\text{CO}_2} \times 0,03}$$

CO_2 total, reprezentînd $\text{CO}_2 + \text{CO}_3\text{H}_2 + \text{CO}_3\text{H}^-$, poate fi măsurat direct pe cînd CO_3H^- nu poate fi determinat direct. Din acest motiv, ultima formă de exprimare a ecuației lui Henderson și Hasselbalch este aplicabilă clinic.

Completînd valorile normale în formula dată se obține, pentru sîngele arterial:

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{25,2 \text{ mmol CO}_2/\text{l} - 40 \times 0,03 \text{ mmol}}{40 \times 0,03 \text{ mmol}}$$

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{25,2 - 1,2}{1,2}; \frac{24,0}{1,2} = 20$$

$$\text{pH} = 6,1 + \log 20 = 6,1 + 1,3 = 7,4$$

Valorile sistemului bioxidului de carbon și combinațiilor sale se estimează uzual prin tehnici moderne fizico-chimice pentru aprecierea capacității de tamponare a sîngelui și a echilibrului acido-bazic.

pH-ul sanguin se măsoară uzual cu electrodul de sticlă cuplat cu un electrod de referință de calomel, amplificînd potențialul generat de diferența de concentrație a H^+ din interiorul electrodului, unde se găsește o soluție de referință cu pH cunoscut, și din soluția de măsurat în care acesta este cufundat. Măsurările au o reproductibilitate de $\pm 0,01$ unități pH, deci în limite cu totul satisfăcătoare.

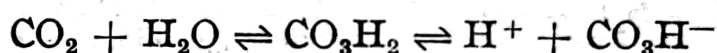
P_{CO_2} poate fi măsurată cu un electrod de sticlă, acoperit cu o membrană de teflon, prin intermediul unui strat de $\text{CO}_3\text{HNa } 10^{-3}$ mol. l^{-1} . CO_2 difuzează prin membrană și hidratîndu-se formează CO_3H_2 , motiv pentru care CO_2 poate fi măsurat pe această cale și

în fază gazoasă. În fapt, se măsoară pH-ul soluției de bicarbonat, care, în prezența CO_2 , se modifică proporțional cu presiunea sa parțială. Etalonarea electrodului se face față de amestecuri gazoase cu presiuni parțiale ale CO_2 cunoscute.

Astrup a propus măsurarea indirectă, prin tonometrarea a două probe de sânge la presiuni diferite cunoscute de CO_2 . Se măsoară după echilibrare pH-ul. Valorile se înscriu pe nomograma Siggaard Andersen, care permite, pe lângă citirea și a altor valori, pe cea a P_{CO_2} .

CO_2 total reprezintă suma $[\text{CO}_2]$ și $[\text{CO}_3\text{H}^-]$, CO_2 incluzând și $[\text{CO}_3\text{H}_2]$. Se măsoară după van Slyke adăugând un exces de acid puternic la un volum cunoscut de plasmă. Se agită bine, apoi se colectează și se evaluează volumul CO_2 degajat. Normal, cantitatea totală de CO_2 este de $1,2 \pm 0,24 \text{ mEq/l}$. Dacă atât bicarbonatul cât și CO_2 se exprimă în vol. % CO_2 , raportul $\frac{\text{CO}_3\text{H}^-}{\text{CO}_2} = \frac{60}{3}$ este egal cu 20.

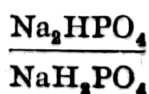
Curba de titrare a sistemului $\frac{\text{CO}_3\text{H}^-}{\text{CO}_2}$ denotă un efect maximal al tamponului la valoarea lui pK' , care este de 6,1. Întrucât pH-ul sanguin poate scădea, în stări cu totul excepționale, până la 6,9, înseamnă că, sistemul $\text{CO}_3\text{H}^-/\text{CO}_2$ nu intervine direct în menținerea pH-ului sanguin. În afară de aceasta, prin intervenția sa se formează un ion H^+ și unul CO_3H^- .



În aceste condiții devine esențială intervenția cuplată cu sistemul $\text{CO}_3\text{H}^-/\text{CO}_2$ a tamponului intraeritocitar reprezentat de hemoglobina acidă/hemoglobinat de K. Oxihemoglobina, în urma disocierii, prin pierderea O_2 devine un acid de 40 ori mai slab, care va schimba K^+ cu H^+ -ionii. Cei din urmă provin din CO_2 respirator, care, după ce difuzează intraeritocitar, formează, împreună cu apa, sub acțiunea catalizatoare a anhidrazei carbonice, H_2CO_3 care, va disocia în H^+ și CO_3H^- . CO_3H^- părăsește eritrocitul, fiind neutralizat în plasmă de Na^+ din NaCl , în timp ce Cl^- generează intraeritocitar KCl .

În felul acesta, în cele din urmă, în sângele capilar apare hemoglobina acidă, care practic nu disociază, iar în plasmă bicarbonatul de sodiu. Prin aceste reacții se asigură în final homeostazia reacției (pH-ului) sîngelui venos.

În plasma sanguină, sistemul tampon de fosfați are un pK' mai aproape de pH-ul sanguin:



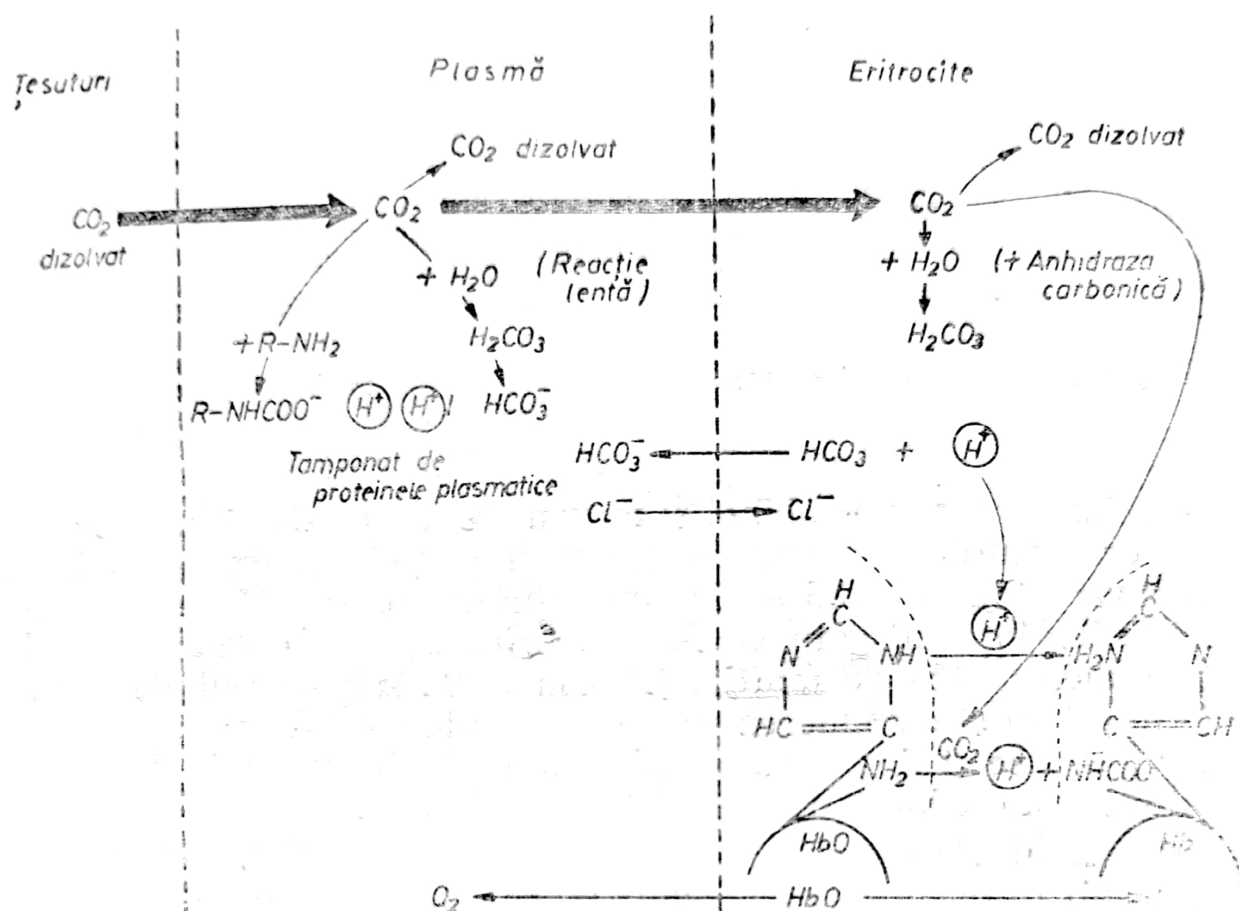


Fig. 12. Reprezentarea schematică a fenomenelor legate de cedarea CO_2 în țesuturi și trecerea sa în plasmă și eritrocite. Este indicată partea principală a moleculei de HbO_2 , dar structura sa nu a fost desenată. Tamponarea ionilor de H^+ este marcată de cercuri care înconjoară ionii de H^+ eliberați și tamponați (după Davenport).

pK' pentru acidul fosforic fiind 6,8, iar raportul de 4 : 1, deci :

$$\text{pH} = 6,8 + \log \frac{4}{1} = 6,8 + 0,60 = 7,4.$$

La fel de importante sînt și diferitele sisteme:

$$\frac{\text{Na proteinat}}{\text{H proteinat}}$$

În reglarea pH-ului sanguin intervin: sistemul respirator, care elimină cu mare promptitudine excesul de CO_2 , precum și funcția de excreție renală, pentru eliminarea acizilor nevolatili.

Modul în care hipercapnia (mărima P_{CO_2} în sînge) și creșterea concentrației hidrogen ionilor (H^+) modifică ventilația pulmonară pentru a menține un schimb adecvat de gaze, în primul rînd homeostazia oxigenului și pH-ului sanguin, este analizat în capitolul reglarea respirației.

CAP. VII.

TENSIUNEA OXIGENULUI ÎN ȚESUTURI ȘI RESPIRAȚIA CELULARĂ

TENSIUNEA OXIGENULUI

Disocierea oxihemoglobinei și ca urmare a acesteia, difuzia oxigenului spre țesuturi în teritoriul microcirculației determină scăderea progresivă a P_{O_2} arterial de la 100 mmHg, la 60 mmHg în arteriole și în medie 46 mmHg în capilare. În exercițiu fizic sau în anoxie poate scădea la 15—20 mmHg. Difuzia O_2 în microcirculație depinde de numărul și dispunerea spațială a capilarelor, de numărul capilarelor deschise și de valoarea consumului de O_2 , variabilă în raport de natura țesuturilor și de condițiile de activitate.

În lichidul interstițial al țesuturilor organismului, oxigenul se găsește sub forma dizolvată. Celulele, consumatoare de oxigen, primesc ca atare prin difuziune, pe măsură ce utilizează oxigenul intracelular, oxigen din lichidul interstițial. La rîndul lor, între țesuturi (lichid interstițial + celule) și sîngele din vasele capilare ale acestora, conținînd atît O_2 dizolvat cît și fixat pe hemoglobină, deci cu o presiune superioară, se stabilește un flux continuu al acestui gaz, pe seama disocierii O_2Hb . Cantitatea de oxigen utilizat depinde de cerințele energetice ale țesuturilor, de intensitatea activității lor. Numai la scăderi foarte accentuate ale P_{O_2} tisular, activitatea celulară este limitată.

Variații rapide ale P_{O_2} tisular apar ca urmare a modificărilor metabolice, circulatorii, respiratorii; normal ele sînt rapid restabilite prin mecanisme locale, sau prin reacții reflexe cu feedback negativ și astfel este menținută homeostazia oxigenului.

Transportul O_2 din capilare prin celule, pînă în mitocondrii, unde au loc procesele oxidative s-ar putea face activ prin procese energetice, prin convecție sau prin difuzie. Pe baza cunoștințelor actuale este admisă numai ultima posibilitate.

Difuzia O_2 depinde în primul rînd de proprietățile fizico-chimice ale moleculelor de O_2 . Diametrul lor mic, sub 1 Å, solubilitatea sa ridicată în lichidele biologice și în lipide, constituenți cantitativ în-

semnați ai membranelor celulare, facilitează difuzia O_2 în organism.

Asigurarea difuziei este condiționată de gradientul de concentrație relativ ridicat între sângele bogat în oxigen care spală rețeaua capilară și tensiunea scăzută (0.1—1 mmHg) a oxigenului în zona mitocondriilor. La baza tuturor modelelor imaginate pentru a explica difuzia oxigenului în țesuturi stă legea lui Fick. În procesul de difuzie, particulele, în acest caz moleculele de oxigen, care se mișcă liber în mediu se vor deplasa, conform legilor fizice din zonele cu concentrație maximă, până la egalizarea concentrației. Cea mai corectă exprimare este însă prin valoarea presiunii parțiale a oxigenului.

Primul care a imaginat un model de capilar pe care a analizat matematic difuzia oxigenului a fost Krogh (1918, 1919). Caracteristic pentru modelul lui Krogh este considerarea P_{O_2} , ca fiind identică de-a lungul capilarului, ceea ce este contrar constatării că anoxia progresa din spre extremitatea arterială spre cea venoasă. Raza unui asemenea cilindru, care asigură nutriția printr-un capilar unic, este de 30—40 μ . Modelul de capilar pe care se bazează această teorie poartă denumirea de cilindru lui Krogh sau cilindru standard. Teoria și modelul lui Krogh au constituit totuși baza tuturor studiilor efectuate ulterior. Ele au suferit, însă modificări, până la formularea unei concepții integraliste, bazată atât pe analize matematice, cât și pe măsurări directe cu microelectrozi a P_{O_2} în capilare și țesuturi de către Grunewald (1968). Modelul structural propus de Grunewald (1977) sistematizează situarea tridimensională a capilarelor în țesuturi (aspectul anatomic). Sub raport funcțional, pe acest model sînt analizate mecanismele și parametrii aportului tisular de oxigen, pe baza primei legi a lui Fick, prin procesul de difuzie. Autorul calculează astfel fluxul molecular de O_2 ($ml/cm^2/s$) în diferitele condiții oferite de structura capilarelor, de particularitățile de circulație a sîngelui, de debitul circulator local și de diferența arterio-venoasă a P_{O_2} , obținînd, prin analiză matematică complexă, valori superpozabile celor stabilite prin măsurări directe.

Lübbers și Baumgärtl (1967), Silver (1965) au elaborat o tehnică de măsurare a P_{O_2} în țesuturi cu microelectrozi de platină, avînd vârful de 1—3 μm . Cu această metodă Lübbers (1972) a arătat că în scoarța cerebrală, P_{O_2} nu are o concentrație identică, ci se pot înregistra presiuni parțiale între 1—5 mmHg și 86—90 mmHg, indicele de frecvență fiind însă maxim între 16—20 mmHg. Deci, în condiții normale se întîlnesc în celulele nervoase valori ale P_{O_2} de 1 mmHg. Numai sub asemenea valori, la care

nici respirația mitocondrială nu-i perturbată, apare reducerea consumului de O_2 cerebral.

Se numește presiune critică mitocondrială a oxigenului, presiunea parțială a acestui gaz la care consumul mitocondrial de oxigen se reduce.

Datorită variațiilor P_{O_2} tisular între 1—90 mmHg în microcirculație, s-a propus pentru aprecierea tensiunii tisulare a O_2 măsurarea valorii acesteia în sângele venos efluent. Scăderea în hipoxii și hipoxemii a P_{O_2} în sângele efluent al creierului la valori sub 19 mmHg (L ü b b e r s, 1972), duce la scăderea consumului tisular nervos de oxigen. Această valoare constituie presiunea venoasă critică a oxigenului.

Este de subliniat că transportul oxigenului din capilare și chiar din alte ramificații ale microcirculației (arteriole, venule) prin pereții acestora se face exclusiv prin difuzie, fără influența vreunui factor de transport activ. Factorii biologici condiționează indirect difuzia oxigenului. Astfel, ea depinde de distanța celulelor spre care are loc difuzia de la capilarul cel mai apropiat, de distanța intercapilară, de raza capilarului, de difuzia O_2 prin peretele capilar și celule, de viteza sîngelui, care cu cît e mai mare întreține o diferență mai ridicată a P_{O_2} și de saturarea și aspectul curbei de disociere a O_2 Hb.

Parametrii funcționali ai microcirculației, cum ar fi creșterea numărului capilarelor deschise prin P_{O_2} redusă, P_{O_2} crescută, pH mai acid, hipertermia și acumularea de metaboliți în organele în activitate, măresc transportul de oxigen din capilare spre țesuturi. În organul activ crește fluxul capilar, viteza sîngelui, și scade distanța intercapilară.

Hipertrofia unui țesut, cu creșterea volumului unităților sale histologice, fără proliferarea capilarelor, cum se produce în cazul miocardului la încărcarea hemodinamică de durată, reduce difuzia oxigenului din capilare spre fibrele cu diametrul mărit de cca 3 ori ($12 \mu \rightarrow 30 \mu$) și produce, prin atingerea pragului critic de utilizare, modificări metabolice și structurale.

Edemul tisular poate produce închiderea unor capilare prin presiune tisulară mărită și creșterea distanței de difuzie, din cauza destinderii spațiilor interstițiale, cu reducerea difuziei oxigenului. S-au descris și modificări de structură de tipul unor scleroze capilare sau degenerescențe, în cursul cărora difuzia oxigenului spre țesuturi, prin pereții ramificațiilor teritoriului microcirculator, poate fi perturbată. Heparina mărește difuzia, probabil prin reducerea coagularii latente parietale.

RESPIRAȚIA CELULARĂ

Dozarea oxigenului din sângele arterial care vine la un organ dat și din sângele venos, care îl părăsește, cu măsurarea simultană a debitului circulator al organului, a cărei greutate se măsoară apoi, permite calcularea cantității de oxigen utilizat în procesul oxidațiilor celulare în ml/g/min. Utilizarea este proporțională cu activitatea organului.

Respirația tisulară se studiază cu tehnica clasică a lui W a r b u r g *in vitro*, pe suspensii celulare sau secțiuni de țesuturi, consumul de oxigen măsurându-se manometric, prin scăderea volumului gazos din recipientul agitat continuă, în care CO_2 produs se fixează chimic pe măsură ce este eliberat. Rezultatele se exprimă pe mg de țesut uscat și oră.

Procesul de oxidare constă într-o pierdere de electroni asociată cu fixarea de oxigen sau într-o pierdere de hidrogen.

Reacțiile de oxidare sînt asociate cu reacții de reducere, electronii neputînd rămîne liberi în mediu. Deci transferul de H^+ și de electroni în materia vie se face de la un sistem redox la un sistem redox, prin donatori și acceptori. Un cuplu redox nu poate ceda electroni decît unui cuplu mai electropozitiv, ceea ce permite previziunea mersului și sensului reacției.

Respirația celulară decurge în cinci etape principale:

1) degradarea glucozei pe cale anaerobă în citoplasmă; 2) oxidarea acizilor grași și aminați; 3) decarboxilarea și oxidarea radicalilor rămași în ciclul lui K r e b s, cu eliberarea de CO_2 și H^+ ; 4) transferul H^+ eliberați și a electronilor asociați pînă la oxigenul molecular, cu formare de mari cantități de energie liberă; 5) înmagazinarea acestei energii (40%) sub formă de ATP și CP.

În materia vie se petrec două tipuri de oxidări:

A) Oxidări prin fixarea oxigenului pe substrat, în proporție de 10% din totalul oxidărilor, dar avînd rol esențial. Sistemele enzimice ale acestor reacții sînt fixate pe microsomi unor organe, în special al suprarenalelor, ficatului, plămînului și placentei. Enzimele sînt de două feluri: *oxigenazele*, care transferă doi atomi de oxigen pe substrat, și *monoxidazele*, care transferă numai un atom de oxigen pe substrat. Monoxidazele sînt reprezentate mai ales de flavoproteine și de citocromi, diferiți de cei ai ciclului respirator mitocondrial. Intervin în oxidarea acizilor grași aminați, a alcoolului, a steroizilor și altor oxidanți toxici.

B) Oxidări prin pierderea de hidrogen sau de electroni de pe substrat; sînt catalizate de dehidrogenaze sau oxidaze care acţionează prin transfer de electroni. Ele reprezintă 90% din consumul de oxigen. Din acestea 85% din oxidaţii se petrec în mitocondrii. Coenzimele lanţului respirator mitocondrial sînt nicotinamid-adenin-dinucleotidul (NAD), flavin-adenin-dinucleotidul (FAD) şi flavin-mononucleotidul (FMN) şi citocromii (hemoproteine, cu rol transportor de electroni prin schimbarea valenţei fierului).

O mică parte a consumului de oxigen (5% în repaus) este catalizată de flavoproteine, care transferă hidrogenul propriu asupra O_2 , formînd H_2O_2 , care este descompusă de o catalază cu elibrare de O_2 . Procesul se desfăşoară în peroxizomi.

Din procesele oxidative celulare rezultă CO_2 , în principal din degradarea glucidelor şi decarboxilarea acizilor aminaţi, şi H_2O prin oxidarea H^+ şi din sinteza ATP. Pe această cale zilnic se produc 200—300 ml H_2O endogenă la om.

CAP. VIII.

ȘOCUL CIRCULATOR

Șocul reprezintă o perturbare majoră a principalelor funcții ale organismului în primul rând a circulației și respirației, urmată de suferințe celulare, care amplifică mecanismele disregulatorii și duc în final la moarte. Prin manifestările sale în orice formă, apar tulburări circulatorii, cu reducerea perfuziei tisulare, generatoare de hipoxie. Șocul circulator apare astfel ca o problemă centrală a homeostaziei oxigenului.

Diagnosticul general de șoc este o abstractizare. De aceea în clinică se distinge, în ce privește etiologia și patogeneza, cel puțin patru forme de șoc: cardiogen, endotoxic, traumatic și hemoragic, ultimul reprezentând forma cea mai caracteristică. Toate formele au numeroase mecanisme comune, dar și unele particularități bine conturate.

MECANISME DE PRODUCERE

Ca mecanism general se poate afirma că șocul circulator este rezultatul reducerii debitului cardiac, putând fi determinat fie de scăderea forței de contracție a inimii și deci a funcției sale de pompă (șoc cardiogen în infarct), fie de descreșterea afluxului venos prin diminuarea volumului sanguin (șoc posthemoragic), scăderea tonusului vasomotor (șoc toxic, traumatic) sau creșterea rezistenței periferice (stress de intensitate).

Vom analiza în cele ce urmează șocul circulator, referindu-ne mai ales la șocul hemoragic, sub raportul perturbărilor homeostaziei oxigenului. În orice formă de șoc, fie prin scăderea forței cardiace, fie prin reducerea sau prin creșterea rezistenței periferice, se produce inițial scăderea debitului cardiac. Efectul primar al acestei

scăderi este activarea sau alteori inhibiția simpato-adrenală, în raport de faza de evoluție, durata șocului și starea animalului. Indiferent de cauze, în cursul șocului se realizează o redistribuire a debitului circulator în diferitele teritorii ale corpului, sub dependență simpato-adrenală și a produșilor de metabolism anaerob. Pompa de ioni nu mai este în măsură să-și mențină funcționalitatea și, consecutiv, apar tulburări metabolice și disfuncții celulare.

Wiggers și Ingraham (1946) au sistematizat evoluția șocului hemoragic în trei etape: de hipotensiune, șoc compensat și șoc ireversibil.

În prima fază, dacă hemoragia încetează, presiunea arterială revine la normal, exclusiv prin mecanisme proprii de reglare; în a doua etapă este necesar un tratament-, transfuzii-, pentru restabilirea funcției circulatorii; a treia fază este rezistentă la orice terapie și se termină cu moartea.

Termenul de șoc ireversibil sau mai exact de „ireversibilitate la transfuzie” (Fine, 1954) nu exprimă mecanismele funcționale patogenetice ale șocului. Din acest motiv, Moore (1960) afirma că „termenul de șoc ireversibil nu poate fi utilizat, deoarece nu are justificare nici biologică și nici terapeutică”. Șocul nu poate fi definit, iar terapia sa nu poate fi interpretată, pe baze empirice, în raport de efectele transfuziei (Selkurt, 1970).

Criticile aduse acestei definiții și explicări a șocului au determinat reconsiderarea sa pe baze biologice. Astfel, Guyton (1951), bazându-se pe rezultate ale experiențelor pe câini, cărora li s-au provocat hemoragii acute, de diferite grade, a stabilit că animalele a căror presiune arterială nu scade sub 45 mmHg se restabilesc, pe când cele cu hipotensiunea sub această valoare mor (Fig. 13). Există deci o valoare critică a hipotensiunii posthemoragice sub care șocul

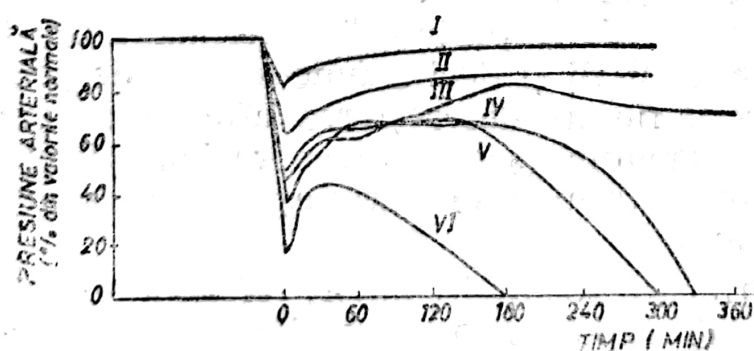


Fig. 13. Presiunea arterială la câini după hemoragia acută de diferite grade. Fiecare curbă reprezintă media rezultatelor obținute pe șase câini.

evoluează printr-un mecanism de cerc vicios. S-a propus denumirea acestei faze șoc progresiv. Dacă șocul nu este suficient de grav, pentru a determina propria sa evoluție, ci prin intervenția mecanismelor compensatoare, circulația se restabilește, presiunea arterială men-

ținându-se peste nivelul critic, starea subiectului este denumită *șoc neprogresiv*.

Tulburarea majoră generată de starea hipotensivă din șoc, constă în limitarea capacității de transport a oxigenului prin reducerea debitului circulator. La scăderea presiunii arteriale la valoarea de 30 mmHg, numai 50% din cerințele în oxigen ale țesuturilor sînt acoperite, prin debitul cardiac realizat în asemenea condiții de hipotensiune. Limitarea debitului de oxigen apare astfel ca prima consecință nocivă a hipotensiunii arteriale, caracteristică șocului circulator. Reducerea sau creșterea hematocritului față de o valoare optimă, precum și a vîscozității sîngelui sînt factori ajutători.

Crowel (1970) a demonstrat că dacă debitul cardiac se reduce cu 25% din valoarea normală, cantitatea totală de O_2 transportată la țesuturi este sub cea necesară proceselor metabolice normale. Astfel, după o hemoragie masivă, rapidă, consumul de oxigen poate scădea cu 10—15% din ceea ce se utilizează în mod normal. Obișnuit scăderea ajunge în jur de 50%. Scăderea consumului de oxigen în condițiile hipotensiunii posthemoragice este deci consecința transportului inadecvat, nu a scăderii cerințelor tisulare.

Efectele hipoxiei și ischemiei generate de hipotensiune nu sînt identice la toate animalele de experiență. Ele diferă în raport cu diferiți factori care intervin în redistribuirea debitului cardiac între organe (Kovách, 1978). Pierderea de sînge determină o activare simpato-adrenală, care, alături de alte efecte, determină vasoconstricție, ca răspuns homeostatic la hipotensiune, cu deosebire în teritoriile circulatorii cu rol de rezervor: piele, intestin, rinichi, cu reducerea debitului în aceste organe. Ca urmare a creșterii presiunii este protejată circulația în organele „vitale”, ca miocard și creier.

Capacitatea de redistribuire internă a debitelor circulatorii ale diferitelor organe, ca răspuns la hipotensiune, prezintă variații de la individ la individ, în cadrul aceleiași specii, diferențe de la o specie la alta. Substanțele farmacodinamice, inclusiv cele anestezice, alterează distribuția. Se pare că gravitatea șocului și durata evoluției sale sînt determinate nu atît de hipotensiune, cît mai ales de modificările ce se produc în final în metabolismul organelor hipoxiate.

În lumina acestor explicații șocul — despre care s-a discutat atît de mult și încă se mai discută — are două forme de evoluție: neprogresiv sau compensat, care nu este propriu-zis șoc, și forma sa progresivă, care reprezintă de fapt șocul. Trecerea din prima formă în a doua este rezultatul depășirii pragului critic al hipotensiunii arteriale.

ȘOCUL NEPROGRESIV SAU COMPENSAT

Se caracterizează prin restabilirea spontană a funcțiilor, prin răspunsul simpato-adrenal și alte reacții ale organismului, care protejează suferința organelor hipoxice. Răspunsul simpato-adrenal apare rapid, la 30—60 s după hemoragie, fiind declanșat reflex prin zonele presoare și în urma ischemiei sistemului nervos. Are loc o ajustare a volumului vaselor la volumul sanguin scăzut și creșterea resorbției lichidului interstițial.

ȘOCUL PROGRESIV

Se instalează dacă mecanismele funcționale proprii sau intervenția terapeutică nu sînt în măsură să compenseze hipotensiunea, care scade sub valoarea critică. Evoluția se realizează prin mecanisme cu feedback pozitiv (cerc vicios). Astfel hipoxia agravează deteriorările chimice și structurale, care generează fenomene clinice noi. Între acestea menționăm: diminuarea randamentului inimii, din cauza reducerii circulației coronariene și a scăderii afluxului venos, insuficiența centrilor vasomotori, coagulare intravasculară diseminată, eliberarea de substanțe toxice și cu acțiune vasodilatatoare din țesuturi și absorbția de toxine microbiene din intestin. Șocul progresează inexorabil spre moarte, după cîteva zile, mai ales din cauza leziunilor renale, viața nemaiputînd fi asigurată, chiar după restabilirea presiunii arteriale prin transfuzii. După Crowel (1969), șocul circulator este total progresiv, deci ireversibil, cînd deficitul de O_2 atinge valoarea de 120 ml O_2 /1 kg greutate.

În terapia șocului, înainte de a deveni progresiv, se impune un tratament complex care vizează toate condițiile ce l-ar putea produce. În general, terapia se orientează în trei direcții: 1) îndepărtarea agentului producător de șoc; 2) provocarea crizei acute în scopul corectării presiunii arteriale scăzute, acționînd pentru aceasta prin creșterea debitului cardiac și nu prin substanțe vasoconstrictoare care întretin cercul vicios, prin agravarea hipoxiei, cu deosebire în rinichi. După Crowel (1970) se dă atropină pentru protejarea intestinului, oubaină pentru întreținerea inimii, hipoxantină pentru înlocuirea bazelor purinice din celule hipoxice și alopurinol pentru a împiedica pierderea hipoxantinei. Antibioticele au rolul de a reduce

invazia bacteriană din intestinul în suferință. 3) Complicațiile vizează suferința renală, a intestinului, tulburări cerebrale, tromboze, embolii, insuficiența cardiacă. Ele se corectează prin măsuri adecvate.

REZERVELE DE OXIGEN ALE ORGANISMULUI

Sînt puțin însemnate și se găsesc în spațiile organismului, care conțin gaze (plămîni, sinusuri, stomac, tub digestiv). Cantitatea totală este de aproximativ 3000 ml. Cea mai mare parte a oxigenului, depozitat sub formă de oxihemoglobină, este de 1 litru, și abia 150—200 ml în mioglobină. Această cantitate de oxigen poate acoperi nevoile metabolice ale organismului în condiții normale, menținînd viața pentru cel mult cinci minute.

Depozitele de oxigen din diferitele teritorii (aerul alveolar, sîngele arterial, sîngele venos, oxigenul dizolvat în umori și cel fixat pe mioglobină) sînt utilizate inegal în caz de deficit de aport respirator.

Cantitatea de oxigen din aerul alveolar a fost calculată în condiții normale ca fiind de 0,064 ml/kg, pe mm P_{AO_2} , iar cea din sîngele arterial de 3,8 ml O_2 /kg greutate. Dacă P_{O_2} alveolar și arterial scad de la valoarea normală de 100 mmHg la limita inferioară încă compatibilă cu viața, care este de 40 mmHg, saturarea cu O_2 a hemoglobinei scade la 75% și 100 ml sînge arterial în loc să fixeze 3,8 ml O_2 , vor fixa numai 2,8 ml O_2 /kg. Capacitatea maximă de fixare a O_2 pe sîngele arterial la respirare de O_2 pur este de 4,2 ml/kg; ea reprezentînd, față de starea de echilibru, o creștere maximă de 25%.

SUBSTITUENȚII DE SÎNGE CU ROL DE FIXARE ȘI TRANSPORT AL O_2

Au fost studiați în ultimul timp în scopul perfecționării terapiei hipoxiilor.

A fost preparată, în diferite soluții, hemoglobină purificată, lipsită total de stromă globulară și prin aceasta și de proprietăți antigenice și coagulante. Administrată i.v. se combină o parte cu hapt-

globina și prin aceasta nu străbate filtrul renal. Restul, disociindu-se o parte în dimeri și monomeri, are inconvenientul că se filtrează în rinichi și în capilarele sanguine spre țesuturi. Timpul de înjumătățire biologic de 3—5 ore îi asigură o funcție de supleere relativ de scurtă durată. Mai apare și inconvenientul că P_{50} scade la 15 Torri și cooperativitatea se reduce.

Alte încercări de a realiza transportori artificiali se bazează pe solubilitatea ridicată a O_2 în siliconi și uleiuri. Ca urmare s-a propus să se utilizeze în acest scop derivați fluorocarbonici, analogi cu hidrocarburile, avînd formula generală $CF_3-(CF_2)_n-CF_3$. În anumite condiții (asociere cu macromolecule pentru a le conferi presiunea coloidosmotică a plasmiei embrionare, prin ultrasunete cu ajutorul surfactanților neionici), aceste substanțe pot transporta cantități de O_2 de 50 ml/100 ml sînge, la o presiune de 760 mmHg. Deși cercetările experimentale în această privință au realizat progrese, sînt necesare încă investigații pentru realizarea condițiilor de inocuitate în vederea aplicării lor la om.

Oxygenoterapia în diferite forme de hipoxie se aplică în condiții normobare și hiperbare. Administrarea O_2 în flux continuu prin sondă traheală, introdusă prin narine, cu un debit de 1 l/min sau sub cort, deci practic la presiunea atmosferică, asigură o creștere a presiunii parțiale a oxigenului în aerul alveolar de la ~ 100 mmHg la 600 mmHg. În aceste condiții de la 0,3% vol. % concentrația O_2 dizolvat în plasmă crește la 1,8 vol. %, creștere ce echivalează, sub raportul capacității de transport al oxigenului în sînge, cu mărirea cu 30% a debitului.

Se mai utilizează respirație de oxigen în condiții hiperbare, în tratamentul unor insuficiențe circulatorii. Respirarea de oxigen la presiunea de două atmosfere, mărește la 3,6% cantitatea de oxigen dizolvat în plasma sîngelui arterial, cantitate în măsură să acopere aproape în totalitate necesitățile țesuturilor în condiții de repaus.

ERITRONUL ȘI ERITROPOETINA

Noțiunea de eritron a fost introdusă relativ recent în terminologia biomedicală, cuprinzând toate eritrocitele organismului, atât mature circulante cât și imature, din măduva osoasă.

Lajtha (1966), într-o analiză a cineticii eritrocitare și a celei progenitoare, a definit foarte sugestiv eritronul ca reprezentând populația de tranzit a celulelor precursorare diferențiate, care derivă dintr-o populație progenitoare a celulei sușe hemopoetice, sub acțiunea eritropoetinei. Definiția eritronului propusă de Lajtha implică eritropoetina ca factor de bază al menținerii și reglării sale. Eritronul reprezintă astfel un organ, care depășește ca volum și greutate cel mai mare viscer, ficatul, și al cărui rol principal, realizat de celulele sale mature, constă în transportul oxigenului și bioxidului de carbon și în menținerea pH-ului sanguin.

Numărul eritrocitelor circulante pe volum de sânge este foarte strâns reglat, datorită acțiunii eritropoetinei, sub controlul direct al căreia se găsește procesul medular de proliferare eritrocitară. Mecanisme de reglare nervoasă și endocrină influențează atât nivelul eritropoetinei, cât și, în mod direct, eritropoeza.

Pentru o mai bună înțelegere a datelor, vom schematiza originea și succesiunea generațiilor seriei roșii în procesul de diviziune și maturare. Stadiul I al eritropoezei reprezintă perioada în care hemocitoblastul se divide într-o celulă angajată eritroid (progenitoare), sensibilă la eritropoetină. Între celulele sușe și cea progenitoare ar exista o generație intermediară de celule presensibile la eritropoetină (Lajtha, 1971).

Urmează sub efectul eritropoetinei al doilea stadiu, cel al celulelor diferențiate roșii: proeritroblast, eritroblast bazofil, eritroblast policromatofil, care au capacitatea de a se divide și a se maturiza în două elemente ale generației următoare. Acest stadiu se admite ca fiind alcătuit din trei generații.

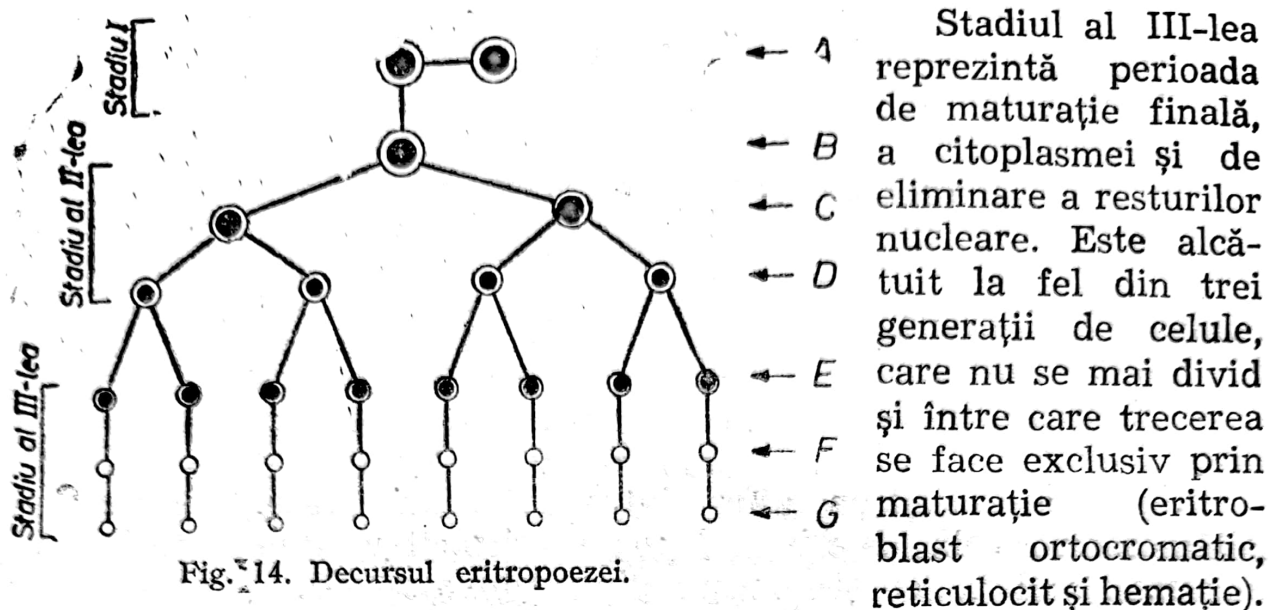


Fig. 14. Decursul eritropoezei.

Printre primii cercetători, P. Bert (1882), Schumann și Rosenquist (1889), Muntz (1891) demonstrează relația dintre aerul rarefiat de altitudine și numărul crescut de hematii circulante la rezidenții la altitudine. Modificările sîngelui la presiuni atmosferice coborîte au fost studiate și prin ascensiuni în balon (Călugăreanu și Henri, 1901). Viault (1890) descrie poliglobulia netă de altitudine, la persoane ce viețuiesc la 4540 m, iar Miescher (1893, 1897) formulează teoria eritropoezei în condiții de hipoxie. El susține că stimulul eritropoetic este reprezentat de deficitul relativ de oxigen al țesutului eritroformator, stimul care acționează direct asupra acestuia, intensificînd formarea și lansarea de hematii. Teoria lui Miescher a dăinuit pînă de curînd, deși în elaborarea ei Miescher s-a bizuit exclusiv pe logică, lipsindu-i orice material faptic. Warren (1941), măsurînd cu metoda Warburg metabolismul măduvei osoase, provenită de la animale normale și cu eritropoeza stimulată, prin hemoragie sau tratament prealabil cu fenilhidrazină, demonstrează existența unui paralelism între nivelul funcției eritropoetice, intensitatea respirației și scăderea toleranței pentru glicoliza anaerobă. Indirect se infirma teoria lui Miescher. Abia în 1948, Rosin și Rachmilewitz (1948) și, la scurt timp, Magnussen (1949), pe culturi de măduvă osoasă *in vitro*, au găsit că presiunea O_2 sub valorile fiziologice (10—12%), departe de a stimula, inhibă proliferarea celulelor roșii medulare. Stimularea directă a proliferării seriei roșii sub influența directă a hipoxiei este infirmată și pe baza observațiilor clinice. Stohlmann, Rath și Rose (1954) descriu observația clinică a unui bolnav cu policitemie, cu prezența ductului arterial, care prezenta eritrocitoză, cu hiperplazia seriei roșii din măduva osoasă normal irigată

și oxigenată din regiunea superioară a corpului și proliferarea mai redusă în zonele hipoxice ale membrelor inferioare. Se confirmă deci „in situ” faptul că nu oxigenarea insuficientă a măduvei roșii eritropoetice în condițiile de hipoxie este excitantul direct al eritropoezei.

Alți autori au atribuit efectul de stimulare a eritropoezei produșilor de hemoliză a căror concentrație crește în condiții de hipoxie. *Cantacuzino* (1900), în laboratorul lui *Mecinicov*, a arătat că prin injectare, subcutanat la iepure, de ser hemolitic, obținut de la cobai, în doză de 1/25 ml, se produce, în următoarele trei zile, o poliglobulie, cu creșterea hematiilor la valori de 8—9 milioane/mm³ și a hemoglobinei de la 85% la 105%. Efectul durează o săptămână; după 2—3 săptămâni valorile revin la normal. De remarcat că dozele mari de ser normal de cobai (5 ml) sau de ser hemolitic (2—3 ml), pe cale i.v., provoacă scăderea hematiilor cu valori ce depășesc în medie un milion. În continuare, *Bogomoleț* (1935), și cu deosebire elevul acestuia *Ujanski* și colab. (1935—1959), au studiat rolul produșilor de hemoliză în stimularea eritropoezei.

Argumente pentru efectul eritrostimulator al produșilor de hemoliză au adus și alți autori (*Zih*, 1930).

O altă direcție de cercetare în domeniul reglării umorale a eritropoezei, care s-a dovedit ulterior deosebit de rodnică, a fost inițiată de *Carnot* și *Deflandre* (1906). Lucrând în laboratorul lui *Bouchard*, aceștia au evidențiat în serul animalelor de experiență, anemiate prin hemoragie, factori stimulatori ai eritropoezei, pe care i-au numit, în opoziție cu hemolizinele descrise de *Mecinicov* și *Besredka* (1900) și studiate sub raportul reglării eritropoezei de *Cantacuzino*, hemopoetine. Serul iepurilor anemiați prin hemoragii masive înainte cu 20 de ore, injectat iepurilor normali în cantitate de 5—9 ml produce, în cursul următoarelor trei zile, o creștere însemnată a numărului de hematii (1—3 milioane/mm³), simultan în diferite vase și asociată cu intensificarea eritropoezei medulare. Serul recoltat de la animalele martore este lipsit de asemenea efecte. Autorii explică menținerea valorii normale a eritrocitelor prin echilibrul existent în plasmă între hemolizine și hemopoetine, intensificarea regenerării singelui în stările posthemoragice datorându-se secreției în exces a hemopoetinelor.

Cercetările care au urmat avînd ca obiectiv verificarea datelor lui *Carnot* și *Deflandre* au fost puțin numeroase și contra-



dictorii. Astfel, dacă Müller (1912) găsește rezultate îndoielnice, Förster (1924), Zih (1930), Tei (1938) evidențiază efecte stimulatoare ale serului anemic, iar alți autori (Gerhardt, 1910, Boycott, Douglas, Price-Jones 1911, Gordon și Dubin, 1934, Feenders 1936) obțin efecte negative.

Bonsdorff și Jalavisto (1948) găsesc eritrocitoză la patru zile după injectarea intraperitoneală a serului de la iepurii expuși la hipoxie timp de patru ore. Pentru mai multă precizie, ei propun ca factorul activ să fie denumit eritropoetină.

Dovezi categorice pentru reglarea umorală a eritropoezei aduce doi ani mai târziu Reissman (1950). În experiențe pe șobolani, în parabioză, el demonstrează că dacă unul din parabioniți este expus la hipoxie, celălalt, respirând între timp aer atmosferic, poliglobulia și hiperplazia eritroidă medulară apar aproximativ la fel la ambele animale. Se impune deci recunoașterea existenței unui factor care, pe cale umorală, trece de la animalul în hipoxie la partenerul normal, factor cu rol în stimularea eritropoezei. Poliglobulia consecutivă apare astfel ca un proces de adaptare, în sensul că asigură, în condiții de hipoxie, un transport mărit de O_2 , prin creșterea hemoglobinei circulante.

Dintre lucrările foarte numeroase, cu tehnici tot mai perfecționate, efectuate în deceniile cinci și șase ale secolului nostru, care au contribuit la elucidarea unor importante probleme ale reglării umorale a eritropoezei amintim în primul rând pe cele ale lui Erslev și colab. (1953). Aceștia determină pe iepuri, din ser omolog, eritropoetina generată prin expunere la hipoxie. Erslev (1954) elaborează un procedeu studiat de obținere a serului anemic homolog pe care îl testează prin administrarea repetată timp de 4 zile, apreciind reacția după reticulocitoză și modificările hemoglobinei.

Borsook, Graybiel, Keighley și Windsor (1954), Gordon, Piliro și colab. (1954) demonstrează activitatea eritropoetică a filtratului obținut prin precipitare, prin fierbere, la pH 5,5, a proteinelor din serul iepurilor anemizați cu fenilhidrazină.

Dezvoltarea impetuoasă și utilizarea pe scară tot mai largă a tehnicilor în domeniul biologiei a avut ca rezultat reluarea și dezvoltarea cercetărilor inițiate de Carnot și Deflandre. Colorația vitală cu albastru brillant cresil pentru reticulocite, perfecționarea metodelor de punție medulară la om (Arinkin) și animale (Nöller, 1957), standardizarea metodelor de măsurare a volumului sanguin total, globular și plasmatic cu coloranți, prin marcarea cu substanțe radioactive fixate pe proteinele serice sau pe hematii (vezi Lawson, 1962), instituirea metodei simple și elegante

cu ^{59}Fe pentru aprecierea nivelului eritropoetinei după cantitatea de fier radioactiv înglobată în hematii (P l z a k și colab., 1955) precum și elaborarea unor metode standardizate de testare a eritropoetinei pe șoricei și șobolani sensibilizați la acest factor, sau *in vitro* pe culturi de măduvă osoasă și, în ultimul timp, a tehnicilor radioimunologice, au deschis perspective deosebit de fructuoase pentru studiul reglării eritropoezei.

Progrese însemnate s-au realizat și pe plan biochimic prin încercările de a obține eritropoetina și pe altă cale decât prin fierberea plasmei anemice, cum ar fi precipitare cu metanol și electro-dializă (B a c i u și colab., 1959), cromatografierea pe coloană cu DEAE-celuloză și rășini schimbătoare de ioni (R a m b a c h și colab., 1958; G r a n t și colab., 1961, G o l d w a s s e r și colab., 1962), ajungându-se astfel la preparate din ce în ce mai pure. Paralel cu aceasta s-au adus date privind structura alfa₁ glicoproteică a factorului activ (R a m b a c h și colab., 1957, 1958; B a c i u și colab., 1957, 1959). Incomplet rezolvată rămâne problema locului de producere a eritropoetinei, precum și a mecanismului de secreție și de acțiune.

OBTINEREA ȘI TESTAREA ERITROPOETINEI

OBTINEREA ERITROPOETINEI

Eritropoetina apare în ser în cursul anemiilor și a altor stări de hipoxie. Pentru decelarea hormonului este necesar ca anemia să fie foarte exprimată, valoarea hematocritului tinzând spre 15%, sau animalul să se găsească în condiții de hipoxie similare celor unei altitudini de 0,4 Ata.

În laborator pentru obținerea unei secreții mărite de eritropoetină, modelul cel mai potrivit este anemia hemolitică, precum și cea posthemoragică.

Eritropoetina a fost mult timp considerată ca o substanță ne-proteică, fiindcă nu precipită cu proteinele la fierberea plasmei la pH acid 5,5 și nici cu acidul percloric. Numai după ce s-a demonstrat că factorul activ rămâne legat de fracțiunea nedializabilă (Erslev și Lavietes, 1954; Stohlman și Brecher, 1956) s-a putut afirma structura sa proteică sau legarea sa de o proteină serică. Este inactivată de tripsină (Slaunwhite și colab., 1957).

Rambach și colab., (1956) au stabilit pentru prima dată o relație între activitatea eritropoetică și concentrația glicoproteinelor în plasmă.

Pentru a verifica dacă eritropoetina este de natură proteică, sau legată de o proteină serică, Baci, Dorofteiu și Rusu, (1958) au studiat modificările proteinelor plasmatice în cursul reacției eritrocitare, provocată prin diferite forme de hipoxie (altitudine simulată, anemie hemolitică fenilhidrazinică, anemie posthemoragică). În toate aceste forme de hipoxie, provocate la șobolan, s-au constatat cu regularitate creșteri ale fracțiunii alfa₁-globulinice a serului cu 16—60% față de valoarea inițială.

Separînd prin electroforeză preparativă pe hîrtie (Baci, 1958) sau prin precipitare cu metanol la temperatură scăzută, după tehnica lui Dubert, Slizewicz, Rebeyrotte și Macheboeuf (1953), fracțiunea alfa-globulinică a plasmei anemice de

iepure și testînd-o pe șobolani, autorii au obținut cu regularitate reticulocitoză și poliglobulie. Prin procedee ulterioare de reprecipitare și de electrodializă a fracțiunii alfa-globulinice, față de apă distilată, la pH 5,2 s-a obținut în supernatant o alfa-pseudoglobulină de natură glicoproteică, omogenă la electroforeza pe hîrtie, cu proprietăți nete de stimulare a eritropoezei (Baciu, Rosenfeld, Dorofteiu, 1959).

Se poate izola prin procedeul de mai sus, din plasma iepurilor anemiați cu fenilhidrazină, o cantitate de 30—50 mg% din această substanță activă. Administrată trei zile consecutiv la șobolani de 150 g, în doză totală de 3 mg, sau la șoareci de 22 g, în doză totală de 1 mg, se constată, a 4-a sau a 5-a zi, apariția unei poliglobulii de cca 1 milion și o reticulocitoză în medie de 300%.

Alți autori au obținut în același timp rezultate asemănătoare privind la natura eritropoetinei. Astfel, Rambach, Cooper și Alt (1958), cu ajutorul cromatografiei pe coloană de DEAE-celuloză, au izolat factorul stimulator al eritropoezei, o alfa-glicoproteină. Rezultate identice au fost obținute de Clotten și Clotten (1959) cu ajutorul electroforezei la înaltă tensiune. Yarosevsky și Șehter (1959) demonstrează că activitatea eritropoetică a plasmei anemice este legată de globulinele plasmaticе, factorul neputînd fi separat prin dializă. Borsook (1959) la fel izolează eritropoetina din plasmă, în fracțiunea glicoproteică.

Utilizarea ca material brut a filtratului de plasmă anemică fiartă, la pH 5,5 (Borsook și colab., 1954, ca sursă de eritropoetină nu este recomandabilă (Stohlman, 1961; Baciu și colab., 1968), deoarece activitatea eritropoetică se pierde în proporție de 70—90% prin fierbere. Pentru a înlătura acest neajuns, mai tîrziu, Kuratowska (1964) pleacă de la fracțiunea IV Cohn, iar Goldwasser și colab., (1962) de la plasma integrală.

TEHNICI UZUALE DE TESTARE

Cele mai multe metode de testare constituie variante, prelucrate în vederea unei evaluări cît mai operative și cît mai exacte, a procedurii inițial, utilizat de Carnot și Deflandre (1906) pentru evidențierea eritropoetinei.

Testarea din ser. Încercările de a elabora un procedeu cantitativ, reproductibil, de testare, în cei 40 de ani care au urmat acestei des-

coperiri, nu au dus la rezultate certe din cauza utilizării cantităților prea mici de ser hipoxic, calității insuficient eritrostimulatoare a acestuia, utilizării de animale receptoare de altă specie, precum și din cauza insuficienței metodelor de apreciere cantitativă a reacției eritrocitare.

Testarea din serul integral homolog a executat-o E r s l e v (1953) pentru a stabili cu certitudine sau a infirma reglarea umorală a eritropoezei. Procedul descris de acest autor constă în administrarea pe cale i.v., la iepuri, zilnic, în doze egale, timp de patru zile, a unei cantități zilnice de 1,5—2,5% din greutatea corporală a receptorului de ser homolog cu activitatea eritropoetică. Reticulocitele și hemoglobina se determină zilnic, obținându-se creșterea cea mai însemnată în zilele 3—5. În general, primele tehnici biologice de testare a activității eritropoetice se bazează pe aprecierea hemoglobinei, hematocritului, eritroblaștilor medulari și reticulocitelor circulante la animale normale, injectate cu produsul de testat. Testarea eritropoeticei din serul sau plasma integrală homologă dă în general rezultate bune, întrucât, la administrarea materialului de testat, ser homolog, reacțiile secundare ce survin sînt minime. Apar totuși, cu serul homolog, efecte hemolitice ce pot fi prevenite prin încălzire la 75°C. Procedul necesită cantități mari de ser și anume 4—10% din greutatea animalului receptor.

Testarea serului activ eritropoetic heterolog pe animale mici a fost efectuată în cazul serului integral de șobolan, care nu provoacă la șoricei reacții secundare (J a c o b s o n și colab., 1968).

Serul integral de iepure, administrat pentru testare la șobolani, provoacă însă la aceștia, în prima fază, o scădere exprimată a numărului de hematii, urmată de reacția eritrocitară secundară, ceea ce face impropriu un asemenea procedeu de testare.

În testarea eritropoeticei, efectul secundar al proteinelor heterospecifice a fost înlăturat prin procedul propus de B o r s o o k și colab., (1954) de denaturare a proteinelor plasmatiche prin fierbere și îndepărtarea lor, pentru testare utilizîndu-se ultrafiltratul.

Plasma utilizată, obținută prin centrifugare din sângele recoltat cu heparină, se aduce la pH 5,5 cu acid clorhidric 0,1 N. Pe baie de apă se fierbe 10 min, apoi se filtrează. Precipitatul se spală de două ori cu apă distilată, adusă la pH 5,5 cu HCl 0,1 N în volum egal, și se filtrează. Filtratele se adună și se aduc la volumul inițial al plasmei. pH-ul este adus cu NaOH 0,1 N la 7,5. Inițial s-a crezut că acest filtrat este lipsit de proteine (B o r s o o k și colab., 1954, G o r d o n și colab., 1954). Ulterior, s-a demonstrat că conține glicoproteine perclorosolubile și nedializabile în cantitate de 50 mg%

(H o d g s o n și colab., 1957), între care și eritropoetina (R a m b a c h și colab., 1957, 1958).

Testarea se face pe grupe de cinci șobolani femele, de 153—196 g. Se administrează zilnic, timp de 9—12 zile, câte 3 ml extract, exprimat în volume de plasmă integrală originală. Se determină hematiile, reticulocitele, hemoglobina, hematocritul.

Separarea eritropoetinei plasmatice din serul de iepure al altor animale și din cel de om după B o r s o o k și colab., a fost utilizată de numeroși autori, cu rezultate pozitive, în vederea testării factorului activ pe șobolan (L i n m a n și B e t h e l l 1956, M i r a n d și P r e n t i c e 1957, R a m b a c h 1958).

Extractului eritrostimulator obținut prin fierberea plasmei sanguine i s-a adus însă obiecția de a nu reflecta fidel activitatea eritropoetică a acesteia, întrucât fierberea plasmei distruge sau denaturează factorul activ în proporție de 70—90% (S t o h l m a n și B r e c h e r 1957). După R a m b a c h și colab., (1958), prin fierberea la 100°C și pH 2, timp de o oră, factorul se distruge total prin desprinderea acidului neuraminic din molecula eritropoetinei.

Testarea după izolarea fracțiunii active prin precipitare cu metanol. B a c i u, R o s e n f e l d, D o r o f t e i u și R u s u (1959), pe baza constatării făcute în 1958, că indiferent de procedeul prin care se provoacă hipoxia animalelor de experiență, se produce cu regularitate creșterea alfa₁-globulinelor serice. Prin fracționare cu metanol la rece a plasmei eritropoetic-active, după procedeul lui D u b e r t și colab., (1953), au izolat fracțiunea II, conținând alfa₁, alfa₂ și beta₁-globulinele. Separând pseudoglobulinele acestei fracțiuni prin electrodializă față de apă distilată, se obține o fracțiune eritropoetic-activă, care, adusă la volumul inițial al serului din care a fost extrasă, conține 50—80 mg⁰/o proteine.

Testarea materialului activ din pseudoglobulinele fracțiunii II s-a făcut pe șobolani de 150—180 g sau șoricei de 22 g. Se administrează zilnic, pe cale subcutanată, o cantitate totală de extract, exprimat în serul din care a fost extras, reprezentînd 2% din greutatea animalului receptor. Examinările hematologice erau executate înainte și după zilele 4 și 5, deci la 24 și 48 ore după ultima administrare, numărîndu-se hematiile și reticulocitele după colorare vitală cu albastru brillant cresil. Se dozează hemoglobina și se determină hematocritul. În investigațiile pentru verificarea procedeu-ului de testare, într-un număr mai redus de experiențe, s-au efectuat și frotiuri ale măduvei eritropoetice la șobolan după N ö l l e r (1957), din măduva recoltată prin perforare cu freza dentară a extremității proximale a tibiei și s-au efectuat determinări ale volumului sanguin.

În condițiile administrării de scurtă durată (trei zile) a extractului serului provenit de la iepuri anemizați cu fenilhidrazină, modificările cantității de hemoglobină și ale hematocritului sînt neînsemnate. Volumul sanguin nu se modifică practic, relevînd valori în limitele celor găsite la martori. Modificări exprimate prezintă tabloul medular. Față de valorile de 27—34% ale elementelor roșii nucleate medulare, găsite la martori, șobolani injectați cu extracte serice active eritropoetice prezintă, în ziua a 5-a, o proporție de 40—53% (6 animale).

Testarea pe o perioadă numai de cinci zile are avantajul de a nu interfera cu apariția anticorpilor specifici față de eritropoetină.

Testarea din urină. În cursul regenerării intense a sîngelui, urina animalelor și a omului dobîndește proprietăți eritropoetice, factorul eritrostimulator urinar fiind identic cu cel sanguin (Hodgson, Toha, 1954).

Urina, de 24 ore, se recoltează și se conservă la -5°C . Se filtrează. Fără a o concentra, se poate injecta la șobolan subcutanat 0,5—3 ml zilnic. Efectele toxice ale urinei se pot înlătura prin dializă și prin adsorbție pe caolin.

Alegerea și prepararea animalelor receptoare pentru testarea eritropoetinei. Problema alegerii celor mai potrivite specii animale pentru testarea eritropoetinei a constituit obiectul a numeroase investigații. Iepurele, șobolanul și șoarecele sînt speciile cele mai frecvent utilizate. S-a utilizat încă cobaiul, ciinele, maimuța și omul. S-a afirmat că șobolanii femele ar fi mai sensibili (Borsock și colab., 1954), fapt însă neconfirmat (Linman și Bethell, 1956).

Inițial, cercetătorii au utilizat animale intacte, care deși reacționează într-un mod mai exprimat specific la eritropoetină, sînt totuși mai puțin sensibile.

Preocuparea de a mări sensibilitatea receptorilor — șobolani sau șoareci — față de eritropoetină a fost soluționată în moduri diferite.

Van Dyke și colab., (1954) au arătat că după hipofizectomie la șobolan, volumul total al hematiilor scade aproape la jumătate în curs de trei luni. Dacă supoziția acestor autori că hipofiza ar secreta factorul de stimulare a eritropoezei a fost găsită nefondată (Crafts, Meineke, 1956), totuși Jacobson și Goldwasser (1957) au propus utilizarea șobolanilor hipofizectomizați, la 8—21 zile după operație, cînd depresiunea eritropoezei proprii e așa de exprimată încît incorporarea Fe se reduce la jumătate din valorile inițiale. În această perioadă, care urmează hipofizectomiei, de maximă depresiune a eritropoezei, se realizează redu-

cerea de zece ori a reticulocitelor din sângele periferic (de la 5‰ la 0,5‰). Reducerea eritropoezei la animalul hipofizectomizat, înainte de apariția anemiei hipofizeoprive, se explică prin reducerea nevoilor metabolice. Datorită acestei modificări, viteza de incorporare a ^{59}Fe în hematii, la aceeași doză de eritropoetină, e de 2—4 ori mai mare la animalele hipofizectomizate.

Deviații standard mari, când testarea se face pe șobolani hipofizectomiți, au fost explicate prin lezarea, în cursul intervenției, în măsură diferită a centrilor hipotalamici cu rol în reacția eritrocitară (Baciu și colab., 1957, 1963), Azi nu se mai utilizează șobolanul hipofizectomizat.

Un alt procedeu aplicat în trecut în testarea eritropoetinei pe șobolani, pentru mărirea sensibilității acestora, constă în înfometarea animalelor pentru testare. După patru zile de inanție, cu administrare exclusiv de apă, eritropoeza acestora se reduce.

După Jacobson și Goldwasser, Fried, Plzak, Jacobson și Goldwasser (1957) și De Gowin și colab., (1962), șobolanilor de 100—120 g, Sprague Dawley, hrăniți exclusiv cu apă 32 ore înainte, li se administrează două zile consecutiv eritropoetină. În ziua a 3-a, se injectează, i.v., $1,0 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$ (citrat). După șase ore (interval în care fierul radioactiv dispăre din plasmă), se recoltează, prin puncție cardiacă, 1 ml sânge și se măsoară radioactivitatea acestuia.

Pe lângă aceste procedee, frecvent utilizate, au fost propuse și altele în vederea mării sensibilității animalelor testate la eritropoetină. Astfel, Bonsdorff și Jalavisto (1948) au imunizat iepuri cu plasmă umană normală, timp de 3—6 zile înainte de administrarea plasmei de testat, prelevată de la bolnavi cu insuficiență cardiacă. Utilizarea mai târziu a extractelor de plasmă ~~neantigenice sau cu antigenitate redusă, face această măsură inutilă.~~

Stohlman și Brecher (1956) propun pentru testarea eritropoetinei utilizarea șobolanilor expuși cu puțin timp înainte unei iradiieri subletale cu Rx, care produce o creștere semnificativă a eritropoezei, în comparație cu receptorii martori, neiradiați.

S-a mai propus utilizarea iepurilor în perioada posthemoragică (Hodgson și colab., 1957), Gordon și Dubin (1934) și a șobolanilor tratați cu fenilhidrazină (Bernard și colab., 1950, 1955). Fenilhidrazina nu e totuși în măsură să mărească sensibilitatea șobolanilor pentru eritropoetină (Baciu și colab., 1961), întrucât eritropoetina endogenă secretată determină ea însăși o reacție.

Testarea eritropoetinei prin aprecierea modificărilor eritrocitelor, hemoglobinei, hematocritului, reticulocitelor circulante și ale tabloului medular reprezintă metode vechi, la care s-a renunțat azi din cauza rezultatelor întru totul orientative, a necesității utilizării unei cantități mari de produs activ, a caracterului laborios al investigației. Reticulocitele, de exemplu, pot ajunge în circulație și din compartimentul de depozit al măduvei osoase. La fel s-a renunțat la procedeele propuse și analizate aici prin sensibilizarea animalelor, rezultatele lor neputând fi întru totul standardizate.

Obiectivul urmărit în etapa următoare a fost elaborarea unor tehnici standardizate *in vivo*, pe șoareci, și *in vitro*, pe culturi de măduvă osoasă, care să necesite cantități cât mai mici de material activ pentru testare, să aibă o sensibilitate cât mai mare, reproducibilitate și să fie cât mai puțin costisitoare și laborioase.

În acest scop, pentru testările *in vivo* se utilizează azi șoareci policitemici posthipoxici (Cotes și Bangham, 1961) sau cu policitemie provocată prin transfuzii (Jacobson și colab., 1957). Prin acest procedeu se suprimă secreția endogenă de eritropoetină, măbind sensibilitatea animalelor test la eritropoetina exogenă administrată. S-a renunțat la animalele sensibilizate prin inaniție.

Șoarecele policitemic posthipoxic se obține prin plasarea în camera barometrică hipobară la 0,4 atm (Weintraub și colab., 1963) sau 0,5 atm (Cotes și Bangham, 1961). După 2—3 săptămâni de hipoxie, în care timp li se administrează în apa de băut citrat de fier ca material de sinteză a hemoglobinei, timp de 1—7 zile, menținuți la presiune atmosferică normală, șoarecilor li se suprimă secreția de eritropoetină. În acest timp, prezintă sensibilitate maximă la eritropoetină. Substanța de testat se injectează în două doze fracționat, în ziua a 4-a și a 5-a. ^{59}Fe se administrează 24 ore mai târziu, animalele fiind sacrificate după două zile, pentru a măsura procentul de fier incorporat în hemoglobină.

Efect similar hipofizectomiei, și anume de deprimare a eritropoezei, exercită policitemia provocată prin transfuzii, când, față de nevoile în O_2 neschimbate, crește aportul de O_2 (Robertson 1917).

Practic, după De Gowin și colab., (1962), se injectează intraperitoneal la șoricea femele 1 ml dintr-o suspensie de 80% hematii în ser fiziologic, după două zile consecutiv. Șase zile, după a doua transfuzie, când hematocritul are valoarea de cca 75%, titrul eritropoetinei endogene a scăzut, animalele putând fi utilizate pentru testare.

Șoriceii policitemici sînt utilizați în acest scop în mod uzual.

Este necesar pentru testare să se selecteze rase de șoareci sensibili la eritropoetina exogenă.

Șoarecele policitemic rămîne totuși și azi cel mai sensibil preparat pentru testarea eritropoetinei. Tehnica cea mai bună pentru obținere este hipertransfuzarea, după care eritropoeza se deprimă complet în următoarele șase zile.

TESTAREA ERITROPOETINEI IN VIVO PRIN INCORPORAREA ^{59}Fe

Tehnica a fost concepută și utilizată prima dată de Plzak și colab. (1955), măsurînd % de incorporare a ^{59}Fe la șobolani receptori. Testarea eritropoetinei se face pe șoareci policitemici, hipertransfuzati cu masă globulară. Se utilizează șoarecii din linia NMRI de 18—22 g, de sex feminin, cărora li se administrează, i.v., timp de trei zile consecutiv, cîte 0,5 ml/animal masă globulară. Se utilizează numai animalele cu valori ale hematocritului între 55—75%.

La interval de 24 ore după transfuzare, se injectează intraperitoneal extractul de testat, cîte 1 ml/animal, în două doze succesive. La 24 ore după ultima administrare a extractului de testat,

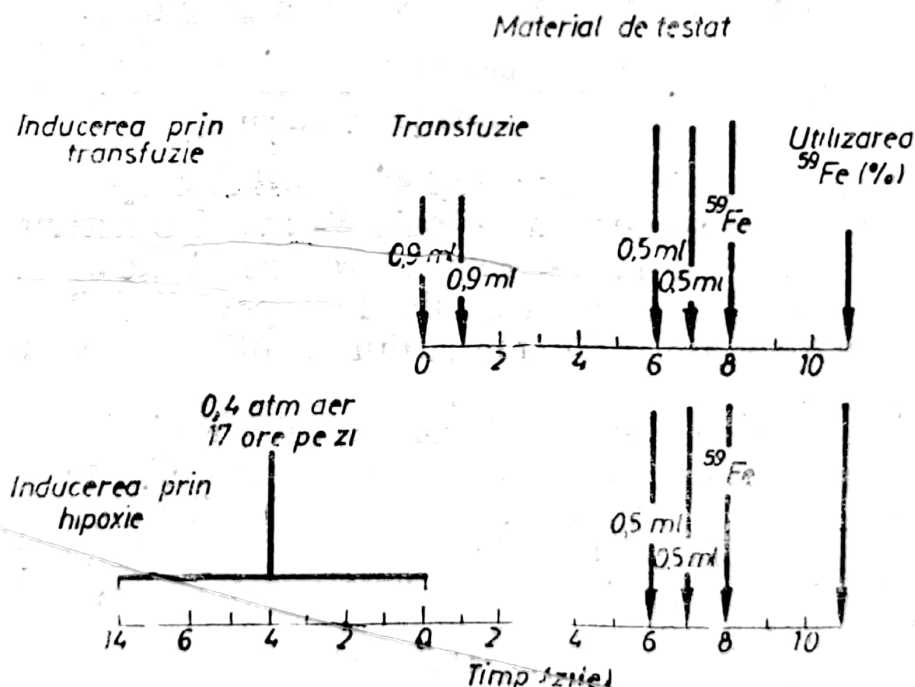


Fig. 15. Schema testării eritropoetinei pe șoareci policitemici hipertransfuzati, sau pe șoareci policitemici posthipoxici.

se injectează ^{59}Fe sub formă de citrat feric amoniacal (produs ROTOP — RDG), avînd o activitate specifică de 3—30 Ci/g. Soluția izotonică sterilă este administrată subcutanat în doză de 0,5 μCi /animal în 0,2 ml ser fiziologic. Simultan, 0,5 μCi se introduc într-un balon cotat de 50 ml. Din balonul cotat se scot de două ori cîte 1 ml, ce se introduc în două eprubete, ceea ce va constitui proba standard. După 24 ore, animalele se sacrifică, măsurîndu-se radioactivitatea sîngelui și a probelor standard, într-un cristal cu puț cu iodură de Na, cu un numărător de particule tip NK 150. Pe baza numărului de impulsuri obținute la numărătoare, prin calcul, se determină incorporarea de ^{59}Fe în eritrocite.

Testarea se poate face și pe șoricei de 18—22 g, expuși în prealabil 17 ore zilnic, în barocameră la presiune de 1/2 atm, timp de 21 zile. Pentru testare au fost utilizate animalele la care, în ziua a 5-a, după scoaterea de la hipoxie, valorile Hb, determinate calorimetric, după metoda Drabkin, sînt mai mari de 20%, iar reticulocitoza este sub 1%. În zilele 5 și 6, după scoaterea de la hipoxie, șoriceii sînt injectați intraperitoneal cu materialul fracțiunii active sau cu ser fiziologic, pentru martori.

În ziua a 7-a, se administrează intraperitoneal 0,2 μCi ^{59}Fe Amer-scham, cu o activitate specifică de 3—20 μCi /g. La 20 ore, animalele sînt sacrificate și se determină procentul incorporării ^{59}Fe în hematii.

Procentul incorporării de ^{59}Fe s-a calculat în raport de activitatea injectată și activitatea totală găsită, conform formulei

$$\% ^{59}\text{Fe} = \frac{\text{număr impulsuri/sînge total}}{\text{număr total de impulsuri/injecție}} \times 100$$

Rezultatele se exprimă în unități standard A preparat de Gold-wasser din plasmă anemică de oaie — avînd o activitate de 3 U eritropoetină/mg proteină —. Exprimarea rezultatelor în U eritropoetină se face comparînd valorile incorporării ^{59}Fe cu valorile incorporării ^{59}Fe produse de standardul A, utilizînd o curbă de etalonare (fig. 16).

Testarea eritropoetinei prin incorporarea ^{59}Fe la șoarecele policitemic prin hipertransfuzie este cea mai sensibilă tehnică de dozare *in vivo*. Pentru evaluarea corectă a datelor sînt necesare minimum cinci animale pe lot. Cu acest procedeu, bine standardizat, De Gowin și colab., (1962) au izbutit să detecteze 0,05 U eritropoetină, după o singură injectare.

Totuși, testul nu este întru totul specific. Incorporarea fierului în eritrocite poate fi influențată și de numeroși alți factori: testosteronul (Fried și colab., 1964), ACTH (Halvorsen, 1963), triio-

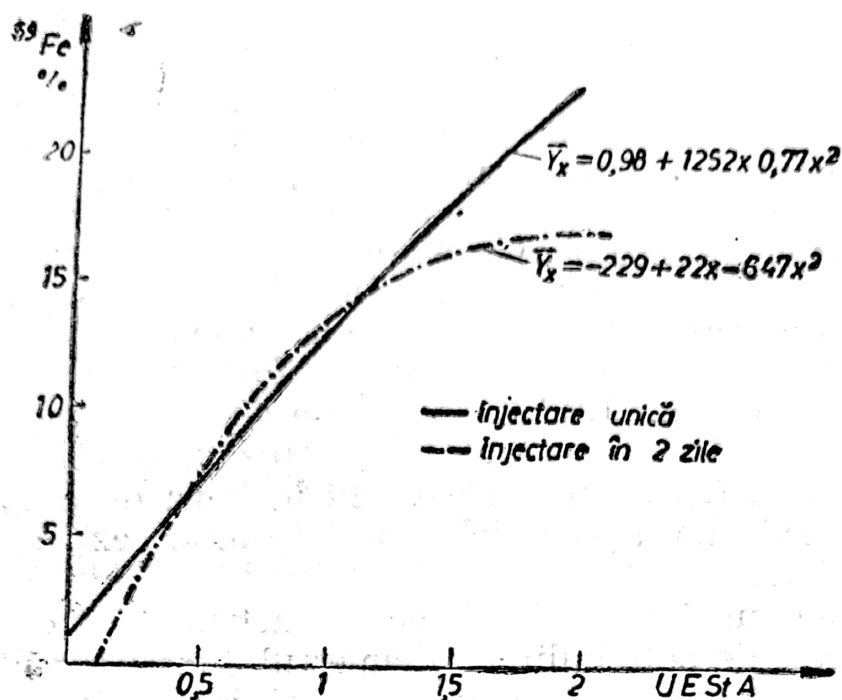


Fig. 16. Curbele de testare a eritropoetinei standard A pe șoareci policitemici prin hipertransfuzare, la o injectare unică și la injectare dublă de eritropoetină, stabilite [în laboratorul nostru.]

dotironina (Fisher și colab., 1967), vasopresina (Jepson și colab., 1968, Baci u și colab., 1968), AMP ciclic (Scholey și Mahlman, 1971; Rodgers și colab., 1974). La fel există posibilitatea intervenției factorului inhibitor al eritropoezei (Krzyszowski și Krzymowska, 1962; Baci u și colab., 1959; Dorofteiu și colab., 1970). Cu toate acestea, procedeul de testare pe șoarecele hipertransfuzat rămâne tehnica de dozare preferențială *in vivo*.

TESTAREA ERITROPOETINEI IN VITRO

Testarea pe celule medulare in vitro. Primele testări de eritropoetină *in vitro* au fost efectuate de Friederici (1963). Acesta constată, la 20 ore după adăugarea de ser activ la culturi de măduvă, creșterea proporției de eritroblăști. Rosse și Gurney (1959) confirmă creșterea proporției eritroblăștilor în culturile de măduvă osoasă după 7—12 ore. Matoth (1962) a arătat că eritropoetina de oaie, parțial purificată, crește numărul mitozelor *in vitro*

în curs de cinci ore. În general, se propune aprecierea proliferării după 5—20 ore.

Întrucît, M. Bessis a arătat existența unui schimb activ de substanțe între proeritroblastul central și eritroblaștii proveniți din aceasta, spre deosebire de autorii citați în tehnica de dozare a eritropoetinei, considerăm necesară păstrarea *in vitro* a structurii de organ a măduvei osoase. O altă problemă a fost stabilirea intervalului de timp la adăugarea eritropoetinei, la care să se obțină răspunsul proliferativ optim, fără apariția fenomenelor de involuție a celulelor medulare suspendate. Tehnica a fost elaborată de Băciu, Borbely-Prodan, 1964. Se lucrează cu o sticlărie neutră, spălată ca pentru culturi de celule și sterilizată două ore la temperatura de 140°C. Operațiile se execută în boxa de preparat culturi de celule, sterilizată în prealabil și în timpul experimentului cu raze ultraviolete.

Pe planșeul unei cutii Petri, cu diametrul de 7 cm, se fixează mai multe inele de polivinilin cu diametrul 8 mm și înălțimea 2 mm, înmuiate într-un amestec de parafină și ceară de albine încălzit la 40°C, după solidificarea căruia se formează tot atâtea cupe. În acestea se realizează culturile: 0,1 ml mediu nutritiv 30% N₁₆ în sol. salină F cu antibiotice, conținând 10% ser de șobolan policitemic posthipoxic; 0,05 ml sol. izotonică în ClNa conținând substanțe de testat; un fragment de măduvă femurală de șobolan.

Măduva osoasă pentru realizarea culturilor primare se recoltează de la un șobolan Wistar de 110 g, în anestezie cu eter. Recoltarea se face strict aseptice. Animalului, plasat pe o planșetă, i se practică secționarea circulară a pielii în jurul toracelui, apoi lamboul inferior este jupuit pînă în regiunea membrelor inferioare sub articulația tibio-femurală. Schimbînd instrumentarul, se izolează și se extirpă cei doi femuri, care sînt plasați într-o cutie Petri sterilă. Aceasta este predată operatorului din boxă, care, cu un bisturiu, secționează epifizele, reținînd cele două diafize. Dislocarea măduvei osoase din acestea se face într-un tub de centrifugă conținînd 2 ml mediu nutritiv. Operația de dislocare este efectuată cu un jet dintr-o seringă de 2 ml adaptată la orificiul femural superior. Măduva se evacuează în aceste condiții în mod compact, avînd o formă cilindrică. Cu două bisturie, într-o cutie Petri, este secționată în fragmente de 0,8 mm. Operațiile se practică la 37° pe o placă încălzită.

Dintr-unul dintre fragmente se realizează două frotiuri. Altul — constituind martorul — este cultivat fără adaus de factor eritropoetic, iar restul se plasează cîte unul în fiecare cupă conținînd substanța de testat. Se incubează la 37° în cameră umedă. După opt

ore, din fiecare fragment se întind două frotiuri și se colorează unul cu verde metilpironină, iar celălalt cu May-Grünwald Giemsa.

Pentru aprecierea activității eritrostimulatoare s-au efectuat și alte cercetări preliminare, S-au numărat, astfel, în cursul incubării la 37°C, din oră în oră, celulele nucleate/mm³ care, în urma proliferării, se desprind din fragmentul ale cărui margini înmuguresc, fiind lansate în mediul de cultură. Se constată creșterea progresivă a celulelor nucleate, cu valoare maximă la 6 ore, după care urmează scăderea lor (Fig. 17).

Împreună cu A. Mureșan, David și Borbely (1965) am arătat scăderea concentrației acizilor nucleici după acest interval.

Reproducem, din câteva protocoale de experiență, descrierea aspectului celulelor explantului medular, colorate pentru acizii nucleici cu verde de metilpironină.

Martor (6 ore de incubare)

Seria eritroblastică reprezintă 30% din totalul elementelor. Granulațiile pironinofile sînt prezente în formele blastice. Gradul de citoliză a elementelor mieloidă nu depășește normalul pentru cazurile de explant.

Martor (12 ore de la incubare)

Explantul are structura ștearsă. Elementele sînt mult autolizate. Se mențin ici colo câteva focare de eritropoeză. Se infiltrează în special explantul cu elemente plasmoreticulare. Spolierea generală de ARN. Proporția eritroblaștilor scade la 20%.

În explantele intens stimulate, cultivate timp de 6 ore, aspectul este total diferit:

Lamele 13, 14, 15 (6 ore)

Focare numeroase de eritropoeză, cu creșterea granulațiilor pironinofile, atît în citoplasmă cît și în nucleu. Megacariocite = 3%, eritroblaști, 50% din totalul elementelor. Seria mieloidă suferă de generescența vacuolară atît a nucleilor cît și a citoplasmei. Apare o adevărată revitalizare a explantelor, avînd în vedere concentrația granulelor pironinofile și proporția eritroblaștilor.

Lamele 31—33 (6 ore)

Se identifică fragmente de explant medular bogate în elemente tinere nediferențiate, de talie mare, cu citoplasmă intens bazofilă. Nucleu cu unul sau mai mulți nucleoli. Se remarcă bogăția în granulații pironinofile, chiar și în eritroblaști poli și oxicromatofili, care se găsesc în proporție normală, deși global eritroblaștii sînt lipoidă. Număr redus al formelor mieloidă. Lacune de distrofie

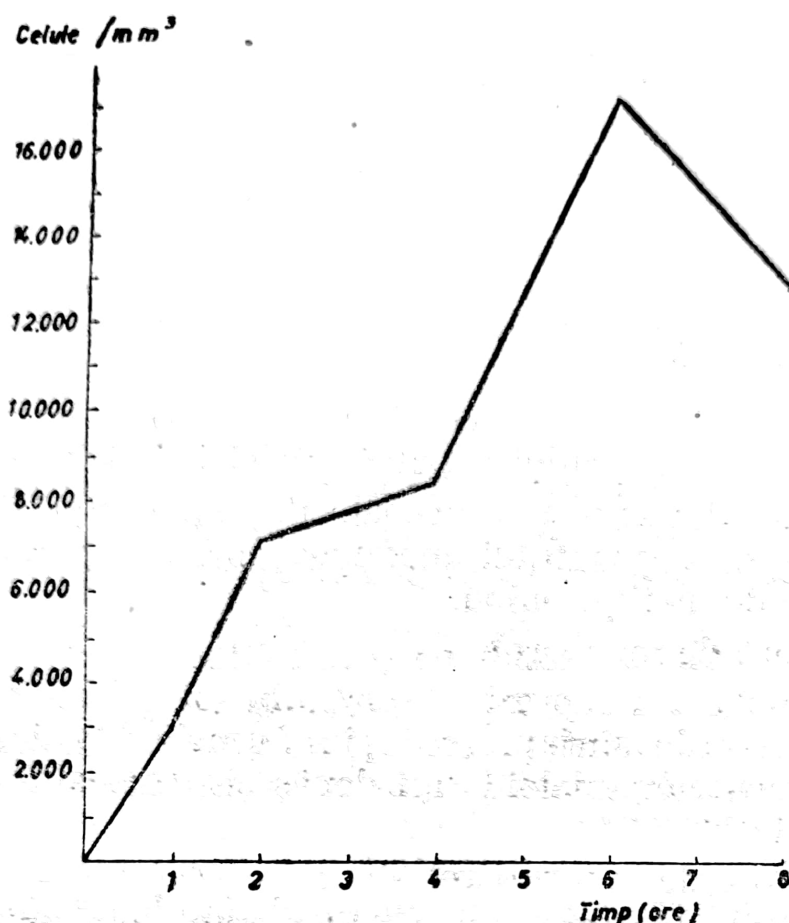
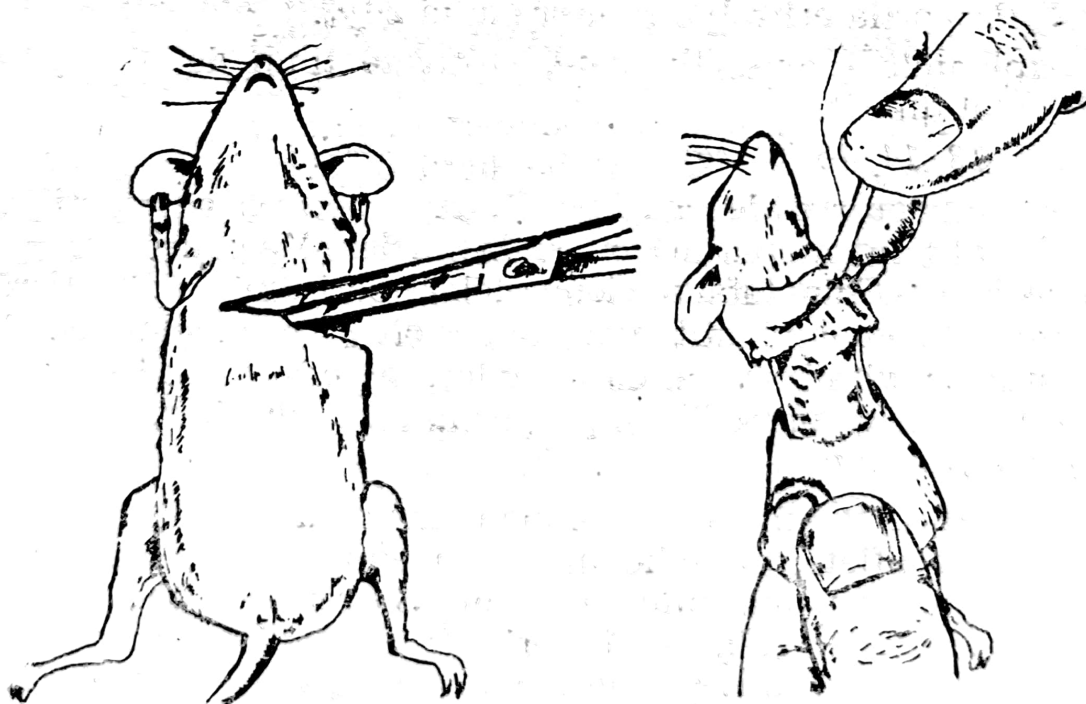


Fig. 17.a. Creșterea celulelor nucleate lansate în mediul de cultură din fragmentul medular, sub acțiunea eritropoetinei.



b. Prepararea șobolanilor pentru obținerea de măduvă osoasă femurală în condiții aseptice în vederea testării eritropoetinei *in vitro*.

Pentru o mai bună standardizare a tehnicii de evaluare, e posibil să se adauge mediului de cultură colchicină, sau să se dozeze, din culturi, acizii nucleici.

Între testările efectuate *in vitro* cu pseudoglobulinele serice active eritropoetic, prin numărarea celulelor nucleate eliberate de explant în mediul de cultură, există un strict paralelism.

Tehnica, așa cum a fost descrisă, s-a dovedit utilă în testările semicantitative orientative, mai ales pentru etapele de extragere și purificare a eritropoetinei.

Kranz și Goldwasser (1965), Goldwasser și colab. (1969, 1972, 1974, 1975) au studiat posibilitatea perfecționării testării cantitative a eritropoetinei *in vitro* pe culturi primare de măduvă osoasă de șobolan, prin dozarea sintezei de ARN (1965), a hemoglobinei (1965) și a glucozaminei (Dukes și Goldwasser, 1965). Recent Goldwasser (1975) a ajuns la o sensibilizare a tehnicii ce permite dozarea între 0,001—1 U. Astfel, Kranz și colab. (1963) remarcă o relație strânsă doză-răspuns între eritropoetina adăugată culturilor de măduvă *in vitro* și sinteza hemului, ea avînd caracter linear în zona de 0,05 și 1,0 U eritropoetină.

Autorii au utilizat suspensii celulare de măduvă femurală de șobolani și au urmărit, de la două ore, procesele induse de eritropoetină. Goldwasser a aplicat tehnica, pe care a perfecționat-o între timp, la testarea eritropoetinei în diferitele etape de purificare și la studiul mecanismului de acțiune a eritropoetinei.

UNITATEA DE ERITROPOETINA

Stabilirea unei unități biologice de eritropoetină s-a făcut relativ tîrziu, întrucît lipsea un preparat stabil al hormonului. White și colab., 1960) au propus ca unitate standard efectul biologic produs asupra eritropoezei de 5 μ M, cobalt, sub formă de clorură de cobalt (CoCl_2), administrat șobolanilor Sprague Dawley aflați în inanție. Clorura de cobalt determină producerea endogenă de eritropoetină. S-a constatat însă că răspunsul este aproximativ același și la 10 μ M și că unele rase de șobolani nu răspund la cobalt (Keighley, 1962). După ce s-a reușit un grad de purificare și liofilizare a eritropoetinei de oaie, devenită astfel mai stabilă, s-a propus ca produsul obținut de Goldwasser și colab. (1962) în cantități mari, în treapta IV de purificare, avînd o activitate speci-

fică de 23 U/mg să fie denumit ca standard A. (Bangham, 1962; Cotes și Bangham, 1966). Unitatea produsului standard A a fost definită arbitrar, reprezentând rotund 0,05 mg din preparatul menționat, în măsură să determine același răspuns ca și o unitate cobalt.

Standardul B a înlocuit precedentul la epuizarea sa. Este reprezentat de eritropoetina umană urinară, reprezentând un preparat crud liofilizat, care s-a dovedit stabil, la 20°C, timp de doi ani, curba doză-răspuns menținându-se nemodificată. Efectul biologic al standardului B este identic cu cel al standardului A, o unitate internațională B fiind egală cu unitatea A sau cu efectul produs de o unitate cobalt. În mg, o unitate B reprezintă 1,48 mg din standardul B uman urinar.

Produsul este un standard internațional de referință păstrat la *Bureau of Standard, National Institute of Medical Research, Mill Hill, Londra, Anglia*, de unde poate fi obținut în cantități minime, pentru etalonări.

Miliunitatea de eritropoetină, reprezentând 0,001 unități, având simbolul *mu*, este utilizată pentru a designa corect cantitățile foarte mici de eritropoetină. S-a mai utilizat și unitatea CS (Keighley și colab., 1959), care corespunde aproximativ la 10 unități standard A.

PURIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA ERITROPOETINEI

PURIFICAREA ERITROPOETINEI

Fracționarea cu metanol. Serul se introduce în tuburi de centrifugă în porțiuni de 20 ml, în fiecare tub se adaugă 10 ml sol. tampon (10 ml NaOH M + 10 ml CH₃COOH M în apă distilată ad 250 ml). După răcirea amestecului la 0°C se adaugă 70 ml metanol 30%, răcit în prealabil la -5°. Se agită. Toate operațiile în continuare se fac la 0°C. După 30 minute beta₂ și gamaglobulinele precipită. Prin centrifugare (3000 rotații, timp de 20 minute) se separă fracțiunea I. Supernatantul se decantează în tuburi de centrifugă. Se adaugă 2 ml acid acetic M, în fiecare tub. După 30 minute se centrifughează pentru a separa în sediment fracțiunea II, care conține alfa₁, alfa₂ și beta₁-globulinele. Acestea se redizolvă în apă distilată, alcalinizată la pH 7—7,3, la volumul inițial al serului.

Obținerea pseudoglobulinelor fracțiunii II. În prima etapă, pseudoglobulinele fracțiunii II se obțin în supernatantul acestei fracțiuni după dializă față de H₂O, din care euglobulinele se elimină prin centrifugare, după precipitare. Euglobulinele fracțiunii II pot fi separate și prin precipitare în urma ajustării pH-ului la 5,2 cu acid acetic 1%. În componenta pseudoglobulinică din supernatant este cuprinsă eritropoetina.

Cromatografierea pe coloană (Baciu, Secăreanu, Vasile, Popa, 1964). Soluția de pseudoglobuline este adusă cu acid acetic la pH 4,6 și încărcată pe coloană de DEAE celuloză (25/2,4 cm), echilibrată cu tampon de acetat, 0,01 M. După încărcare se spală coloana cu tampon de acetat pH 4,6—0,01 M până la valori de extincție ale efluentului sub 0,05 (Lowry și colab., 1951).

Prin scăderea pH-ului soluției de eluție la 4,2 și apoi la 3,6, fracțiunea activă, care conține 1/3 din proteinele încărcate, se eluează la pH 3,6, 0,01 M, ea reprezentând fracțiunea cromatografică III. Este omogenă și conține întreaga activitate eritropoetică.

Cu toată omogenitatea electroforetică și prin cromatografierea pe coloană a extractului obținut, erau necesare argumente convin-

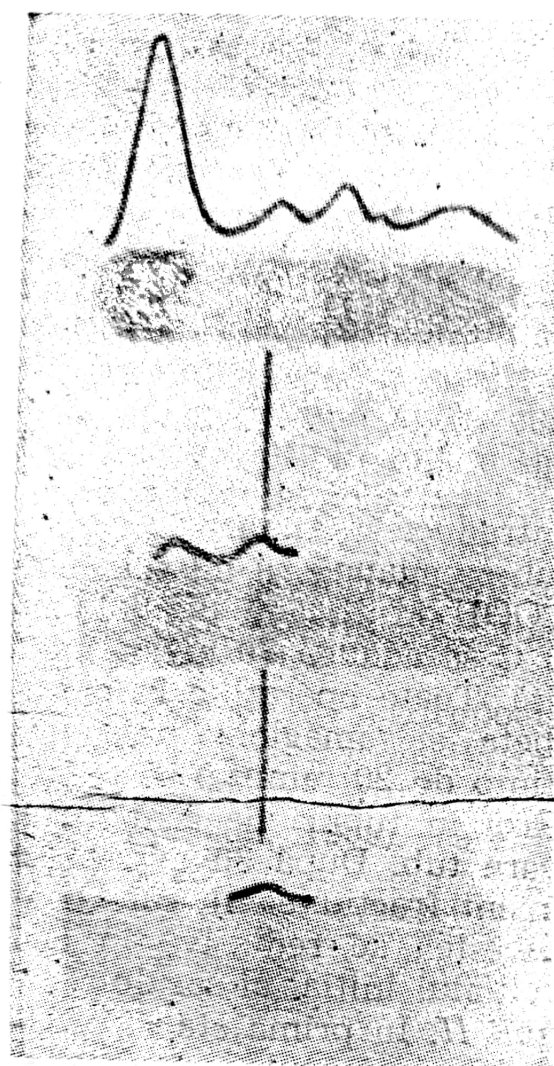


Fig. 18. De sus în jos: electrofo-reogramele: ser anemic de iepure; fracțiunea II-a; pseudoglobulinele fracțiunii a II-a, izolate prin pre-cipitare cu metanol la rece și elec-trodializă față de apă distilată.

gătoare pentru a se demonstra că ex-tractul conține exclusiv eritroprotei-nă. În acest scop, s-a efectuat aceeași operație de extragere a pseudoglobu-linelor din ser normal de iepure și apoi s-a făcut cromatografierea cu aceeași tehnică. A rezultat că între concentrația fracțiunii a III-a de elu-ție din serul animalelor de control, lipsit practic de eritropoetină, și din serul celor anemiate, nu există dife-rențe cantitative semnificative; s-a ajuns astfel la concluzia necesității purificării în continuare a extractu-lui. S-a apreciat că fracțiunea activă conține cel puțin $2/3$ alfa₁-pseudo-globuline inactive, care se găsesc și în serul normal. De aceea s-a tre-cut la recromatografierea acestei fracțiuni. În acest sens, ipoteza noas-tră de lucru, după care creșterea al-fa₁-globulinelor în condiții de hipo-xie s-ar putea datora creșterii eri-tropoetinei s-a dovedit falsă, în sen-sul că, aflându-se în cantități foarte mici în ser, ea n-ar putea explica această creștere. Faptele au demon-strat în continuare însă apartenența eritropoetinei la această fracțiune.

Recromatografierea fracțiunii ac-tive pe DEAE-Sephadex. Fracțiunea activă eluată de DEAE-celuloză, cu acetat 0,01 M, pH 3,6, se recro-matografiază pe coloană de DEAE Sephadex A 50 Medium (25/1,8 cm), echilibrată în prealabil la pH 4,6 cu sol, tampon de acetat 0,01 M. După scăderea valorilor de extincție optică la fotometrare sub 0,05, în efluentul coloanei de DEAE-celuloză, eluția se con-tinuă exclusiv prin coloana de DEAE Sephadex, conectată la prece-denta. În această etapă, s-au utilizat soluții tampon de acetat cu mo-laritate crescândă, 0,01, 0,02 și 0,03 M. Efluentul a fost colectat auto-mat în porțiuni de 5 ml, debitul în cele două coloane fiind de 20 ml/oră.

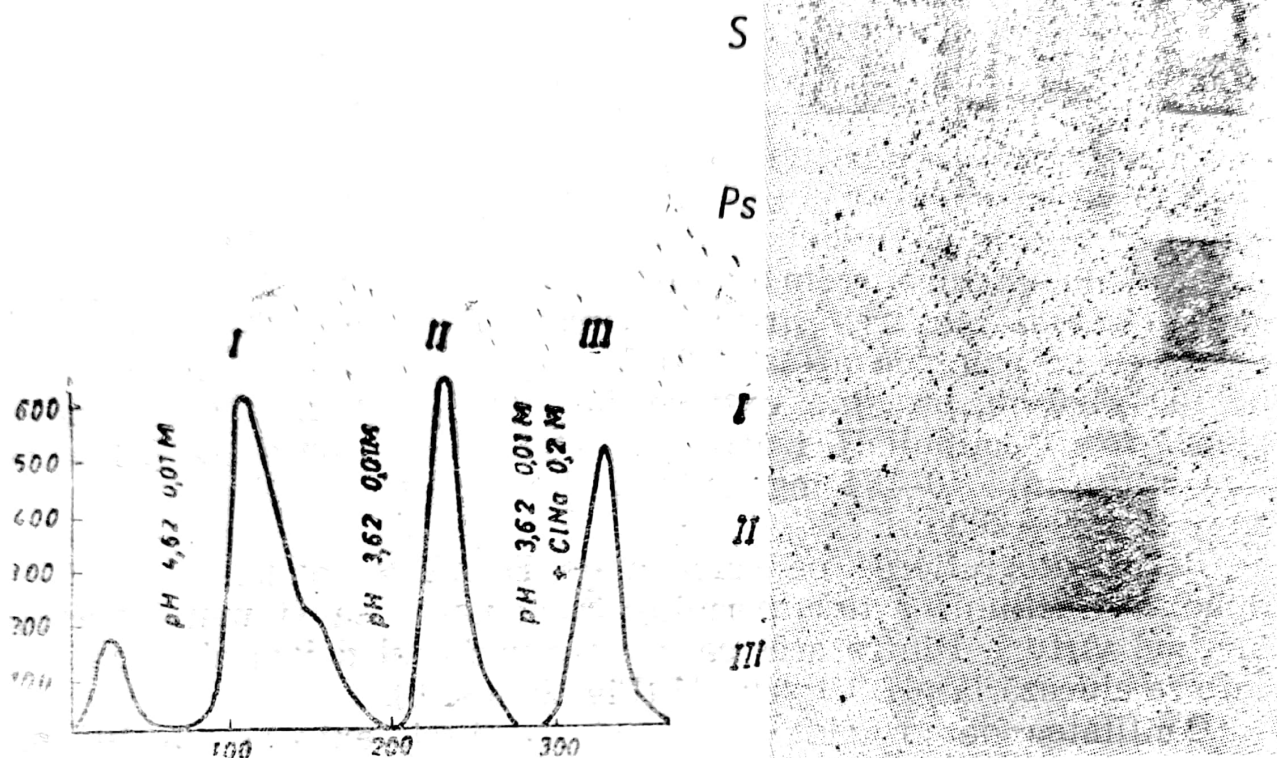
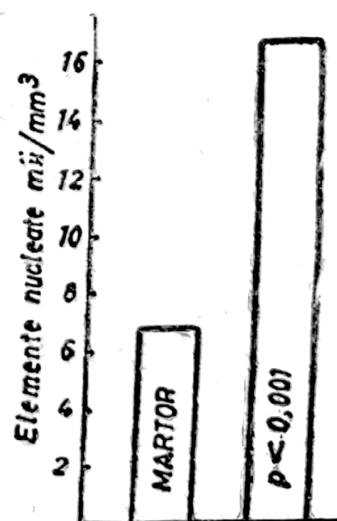


Fig. 19. a. Cromatografierea pe coloană de DEAE celuloză echilibrată la pH = 5,6 cu tampon acetat-acid acetic 0,01 M a pseudoglobulinelor obținute din ser anemic de iepure. Eluția se face cu tampon acetat-acid acetic 0,01 M; pH = 4,62; 3,62 și 3,62 + NaCl 0,2 M. Frațiunea activă se eluează la pH 3,62 0.001 M. S = ser de iepure integral. PS = pseudoglobulinele. I, II, III. = fracțiunile eluate.

Fig. 19. b. Testarea fracțiunilor obținute la pH = 3,62 cu acid acetic-acetat 0,01 M. Testarea a fost făcută pe cultură de măduvă în raport de lansarea de celule nucleate din ex-plantul medular în mediul nutritiv.



Proteinele, din fracțiunile cromatografice luate izolat, au fost precipitate cu 5 volume acetonă. Precipitatul, reluat prin centrifugare după uscare la vid, a fost rezolvit în apă distilată și dializat 24 ore față de apă distilată. După îndepărtarea precipitatului ce se formează, supernatantul a fost liofilizat.

Eritropoetina crudă, obținută din serul anemic de iepure, prin precipitare cu metanol la temperatură joasă în fracțiunea II și concentrată apoi în pseudoglobulinele acestei fracțiuni, după îndepărtarea euglobulinelor, cromatografiate pe coloană de DEAE celuloză, se fracționează în trei vîrfuri. Eritropoetic este activă fracțiunea eluată cu sol. tampon acetat 0,01 M și pH 3,6. Din cantitatea totală de 300—400 mg proteine, extrase din 100 ml ser anemic în pseudoglobulinele fracțiunii II, fracțiunea activă, eluată de pe DEAE celuloză, reprezintă 40—64 mg, extrase din 100 ml ser, deci o concentrare de 180—200 ori.

Recromatografierea pe coloană de DEAE Sephadex A 50 Medium a fracțiunii active permite fracționarea sa și mai avansată în cinci vîrfuri. Dintre acestea e activ vîrful al doilea al fracțiunii, care se eluează la pH 3,6, 0,01 M (Fig. 20 a și b).

Cantitatea de proteine a acestei fracțiuni, extrasă din 100 ml ser, este între 2,5 și 8,5 mg, ceea ce reprezintă o concentrare a activității biologice, raportat la materialul proteic, de 900—2300 ori.

Activitatea biologică a eritropoetinei s-a testat *in vitro*, pe culturi primare de măduvă osoasă, și *in vivo*, pe șoricei cu ^{59}Fe .

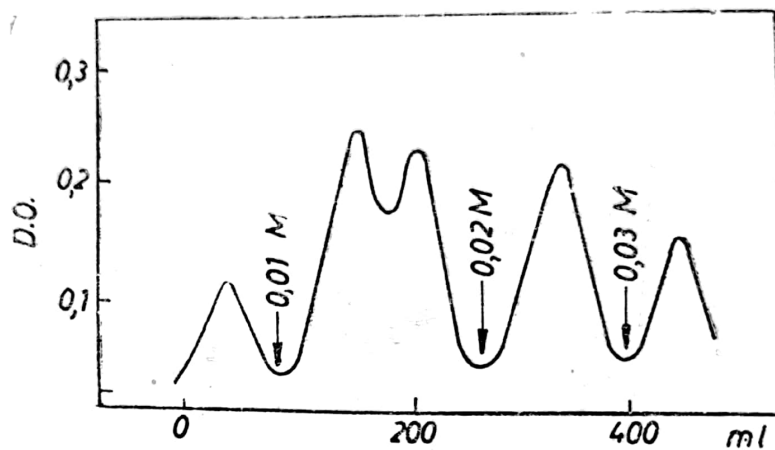
Cea mai avansată purificare cu acest procedeu a fost de 8000 ori, raportat la proteinele totale serice. Dar analiza produsului în gel de acrilamidă a arătat (Baciu, Vasile, 1971) prezența mai multor fracțiuni electroforetice, ceea ce ilustra și de această dată un grad insuficient de purificare.

Filtrarea în gel de Sephadex G—150. La cromatografierea prin filtrare în gel de Sephadex, în care separarea se face în funcție de greutatea moleculară, eritropoetina se eluează într-o fracțiune între 340 și 380 ml. La testarea activității eritrostimulatoare din diferite zone ale vîrfului se constată o activare maximă în zona centrală a vîrfului, unde se obține o activare specifică de 160 U/mg proteină (5 μg proteină determină o incorporare a ^{59}Fe de 12,98—0,8%) pentru o purificare de 35 000 ori și o recuperare a activității biologice de 60% (Fig. 21). Prin testare *in vivo*, pe șoricei policitemici, nu s-a identificat activitate în alte zone de eluție.

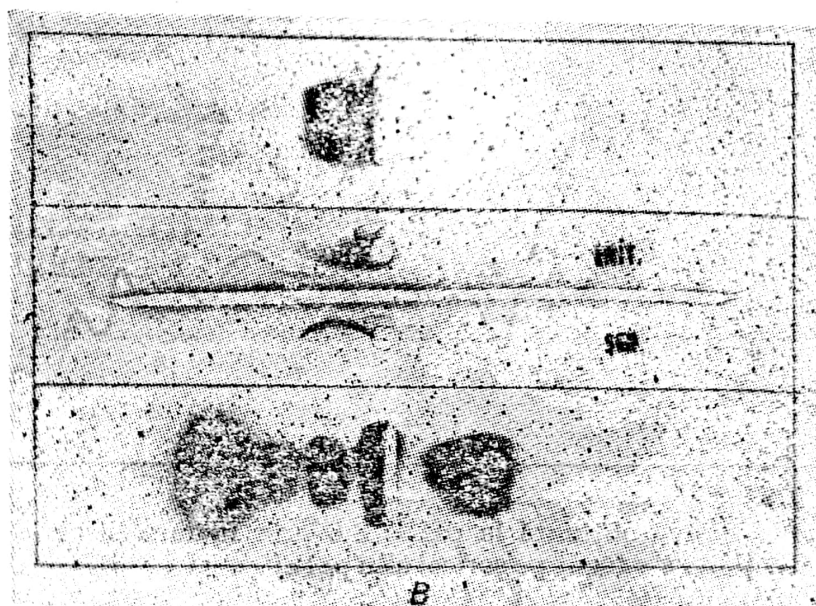
Cantitatea extrem de mică de material obținută (1 mg) nu a permis efectuarea unor analize fizico-chimice. La electroforeza pe acrilamidă se constată prezența a patru fracțiuni.

Procedeul utilizat, foarte laborios, ducea la pierderea a 40—60% din activitatea biologică.

Mai târziu, Baci, Vasile, Pavel, Olteanu, Toader și Băiescu elaborează un procedeu operativ, cu randa-



A



B

Fig. 20. Recromatografierea pe DEAE Sephadex (A) și analiza imunelectroforetică a fracțiunii active (B), reprezentată de vârful al doilea obținut cu tampon acetat $\text{pH} = 3,6$ 0,01 M. După conținutul în proteine rezultă o purificare de 900—2300 ori, conținând 20—50 U/mg, cu o recuperare de 60% a materialului activ. Analiza imunelectroforetică cu antigenul reprezentat de această eritropoetină purificată, indică apariția a două linii de precipitare față de eritropoetină, precum și față de serul integral conținând eritropoetina, ceea ce denotă că materialul necesită încă purificări în continuare.

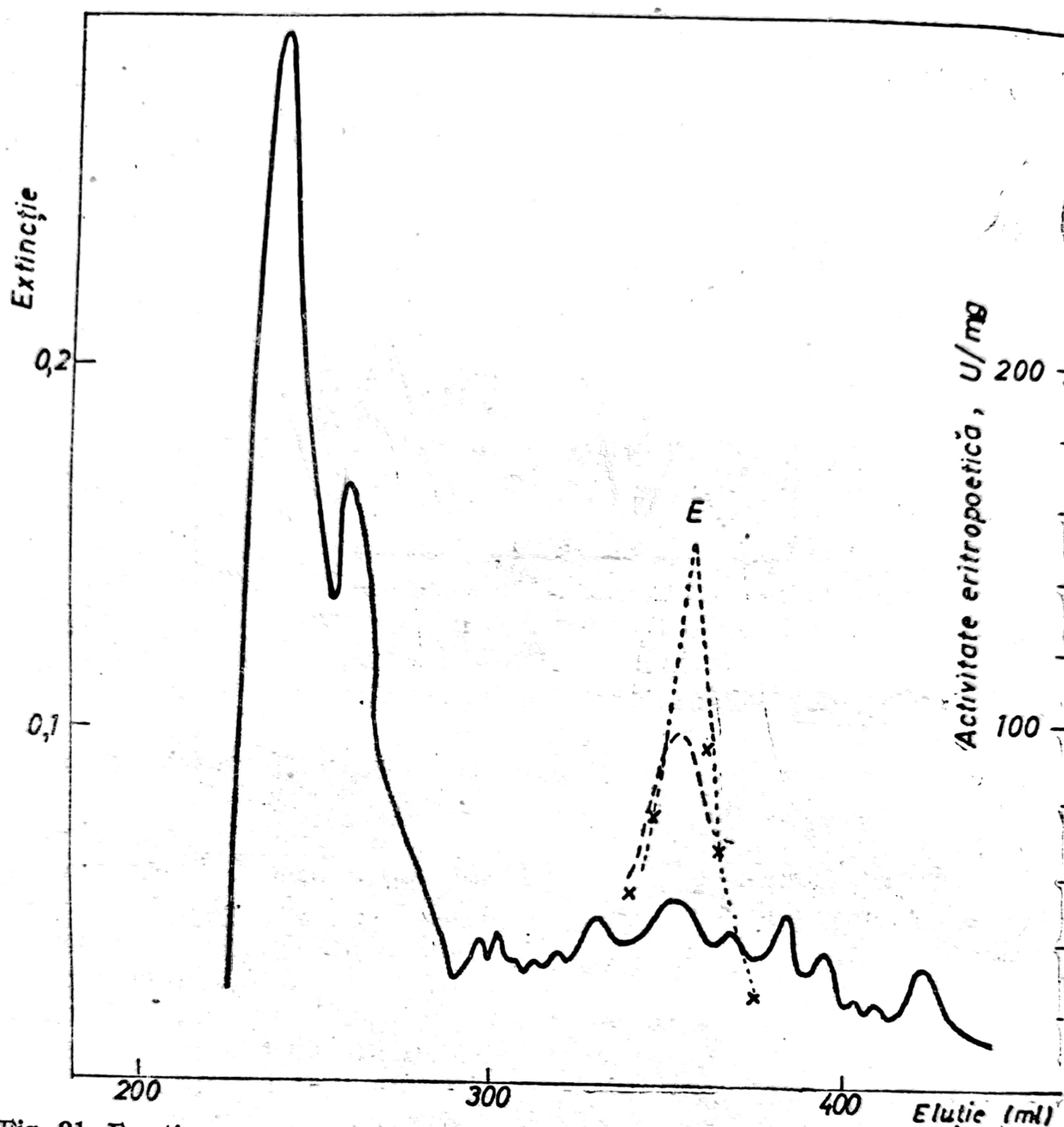


Fig. 21. Frațiunea activă obținută la $\text{pH} = 3,6$ prin filtrare în gel de Sephadex (E). Testarea fracțiunii s-a făcut pe șoricei albi policitemici. Purificare 35 000 x.

ment superior, pentru izolarea, fracționarea și purificarea avansată a eritropoetinei sanguine și urinare (cercetări nepublicate).

Eritropoetina s-a preparat în cantități mari de la oaie, utilizând animale de la abator. Anemierea berbecilor tineri de 1 an s-a făcut prin 2—3 sîngerări repetate pentru a realiza o scădere a hematocritului între 10—20%. Sîngele se recoltează parțial sau în totalitate, se separă serul prin centrifugare. Din ser se testează eritropoetina prin incorporarea ^{59}Fe în eritrocitele șoarecelui policitemic.

Rezultatele arată că titrul eritropoetinei crește progresiv pînă la 20 h, pentru ca, între 20 și 48 ore, să nu fie diferențe mari, în ceea ce privește concentrația eritropoetinei în plasmă, la animalele la care s-a reinjectat plasma.

4 h	incorporare ^{59}Fe	7,6%
8 h	„ „	17,4%
20 h	„ „	22,0%
48 h	„ „	26,7%

La animalele la care s-a reinjectat dextran, s-a constatat că, la aceleași intervale de timp, titrul eritropoetinei este foarte scăzut la 4 h și la 8 h și animalele nu rezistă la un interval de peste 24 h. S-a stabilit în acest fel că pentru obținerea de eritropoetină înlocuirea masei sanguine cu soluție de dextran nu este convenabilă, deoarece se reduce producerea de eritropoetină și scade rezistența animalelor.

Scăderea producției de eritropoetină după injectarea i.v. de particule de cărbune coloidal, precum și mecanismul prin care se realizează s-a analizat în altă parte, relativ la biogeneza eritropoetinei (vezi pag. 116).

În urma anemierii berbecilor prin sîngerare, se poate stabili o relație între hematocrit și % incorporării ^{59}Fe în eritrocite (Tab. III).

TABELUL III

**VALORILE ÎNȚIALE ȘI FINALE ALE HEMATOCRITULUI LA
BERBECI ÎN RAPORT CU NIVELUL ACTIVITĂȚII
ERITROPOETICE.**

	<i>Hematocrit</i>		<i>Incorporare ^{59}Fe</i>
	<i>Inițial</i>	<i>Final</i>	
1	46%	36%	4,1%
2	41%	21%	4,1%
3	40%	20%	4,1%
4	35%	10%	18,68%
5	32%	17%	14,57%
6	38%	12%	17,69%
7	32%	14%	9,89%
8	42%	14%	9,71%
9	40%	16%	10,1%
10	40%	16%	11,7%

Din rezultatele prezentate se observă că pînă la un hematocrit de 20% nu se obțin decît cantități extrem de mici de eritropoetină, titrul mare de eritropoetină se obține la un hematocrit cuprins între 10—15%, ceea ce concordă cu datele din literatură.

Procedeul stabilit pentru anemierea animalelor permite obținerea unui ser cu titrul convenabil de eritropoetină, într-un interval de timp scurt, putînd fi aplicat pe scară industrială, în condițiile sacrificării animalelor în abatoare.

Pentru extragerea eritropoetinei serul anemic activ se diluează cu 4 volume apă bidistilată și i se adaugă acetat de Zn, pînă la realizarea unei concentrații 0,08 M. Se agită 30 min. Precipitatul abundent, ce se formează, se îndepărtează. Eritropoetina rămîne în supernatant. Acestuia i se adaugă DEAE-celuloză, echilibrată la pH 6,8. Se agită trei ore, se lasă să se sedimenteze, după care DEAE-celuloza se spală cu tampon, pH 6,8, 0,05 M. După spălare, se eluează cu același tampon 0,2 M. Din lichidul de eluție se precipită cu acetonă sau cu alcool. Precipitatul se solvă în H_2O , se dializează și se liofilizează. Recuperarea eritropoetinei este de 90%; 1 mg proteină conținînd 3 UE. Se realizează deci o purificare de 200 ori.

Eritropoetina umană a fost preparată din urina bolnavilor cu anemie aplastică. În scopul extragerii eritropoetinei urinare, urina a fost recoltată în vase de plastic, i s-a adăugat fenol, pentru conservare, și a fost congelată la -5° pînă la utilizare. După îndepărtarea sărurilor precipitate, se aduce la pH 6,8 și se adaugă acetat de Zn pînă la concentrația 0,08 M. Precipitatul se îndepărtează. Supernatantului, în care se găsește factorul eritropoetic activ, i se adaugă acid benzoic (sol. alcoolică 40%). Se agită 30 min, apoi se lasă să sedimenteze. Precipitatul se centrifughează, se spală și se solvă în alcool TRIS. Prin reprecipitare cu alcool absolut a proteinelor se îndepărtează și acidul benzoic rămas. Se dizolvă în ser fiziologic, de unde se precipită cu acetonă (5 vol.). Se solvă în apă distilată și se liofilizează.

Cu procedeul descris se recuperează 90% din activitatea biologică, preparatul conținînd 12 U/mg.

CARACTERISTICI FIZICO-CHIMICE ALE ERITROPOETINEI

Este bine știut azi că eritropoetina este o alfa-glicoproteină serică, migrînd electroforetic în zona dintre α_1 și α_2 -globuline (Rambach și colab., 1956, Baci u și colab., 1958, 1959). Da-

torită mobilității electroforetice incerte între α_1 și α_2 -globuline, au existat divergențe asupra apartenenței sale la una din aceste fracțiuni. Cu procedeele actuale s-a precizat apartenența la α_1 -globuline (Baciu și colab., 1969).

Determinarea proprietăților fizico-chimice și a constituției eritropoetinei au progresat lent din cauza dificultăților de obținere a unor cantități suficiente de eritropoetină pură. În acest scop, se folosesc uzual plasmă de oi anemiate sau urină umană de la subiecți anemici.

Primul succes remarcabil în purificarea eritropoetinei a fost realizat de Goldwasser și Kung (1972). Autorii au realizat o purificare de 930.000 ori prin cromatografiere repetată a extrasului de plasmă anemică de oaie pe coloană de DEAE-celuloză, Amberlite X E 97 Sephadex sulfoetil și gel de fosfat de calciu. Autorii au obținut o eritropoetină care, la ultracentrifugare, are o greutate moleculară de 50 000—60 000 și o activitate biologică de 6500 UCo/mg proteină. În 1971, aceiași autori, cu tehnici perfecționate, izbutesc să realizeze un factor de purificare de peste 1.000.000, obținând un material purificat cu activitate specifică de 9200 U/mg.

Goldwasser și Kung (1971), prin electroforeză în gel, în prezența dodecilsulfatului, stabilesc, pentru eritropoetina serică de oaie, greutatea moleculară de 46.000, iar după desializare, 41.000, utilizând micrometoda lui Weber și Osborn (1969). Aceiași autori (1972) au stabilit că molecula glicoproteică a eritropoetinei purificate conține 26% glucide și 74% proteine. Glucidele sînt reprezentate de acidul sialic 10%, galactoză 6%, manoză 4%, glucozamină 4% și glucoză 2%.

Espada și colab. (1972) găsesc în compoziția eritropoetinei umane urinare 65% proteină, 13% hexoze totale, 8,9% hexozamină și 7,5% acid sialic. Restul de 5% ar putea fi substanțe neidentificate, sau o eroare datorită umidității.

O performanță remarcabilă realizează Miyake, Kung și Goldwasser (1977) în purificarea eritropoetinei umane din 2250 l de urină a subiecților cu anemie aplastică. Procedul se realizează în șapte timpi, cuprinzînd: cromatografierea pe schimbători de ioni, precipitare cu etanol, filtrare în gel și cromatografie de adsorbție. Produsul final are o greutate moleculară de 39.000 și o activitate biologică de 70.400 U/mg. Este omogen, avînd o singură componentă electroforetică în gel de poliacrilamidă la pH 9, în prezență de sodiu dodecil sulfat la pH 7 și în prezența de triton X 100 la pH 6.

Față de această purificare avansată în care se obține o eritropoetină avînd o activitate specifică de 70.400 U/mg, afirmația că

eritropoetina cu activitate de $\sim 10\,000$ U/mg conține mai puțin de 30% contaminanți (Espada, 1977) necesită revizuire.

In vivo, după adăugarea de neuraminidază, extractele de eritropoetină se inactivează (Lowy, 1960). Eritropoetina astfel tratată, încărcată pe măduva osoasă *in vitro*, își păstrează activitatea biologică. Acidul neuraminic ar avea deci rol de protector și transportor *in vivo*.

Dacă conținutul în aminoacizi ai lanțului peptidic nu a putut fi încă precizat, se știe totuși că grupările hidroxilice ale serinei sau treoninei nu sînt necesare pentru efectul său biologic; la fel nu sînt necesare grupările sulfhidrilice. În schimb, acțiunea biologică este legată de prezența grupărilor fenolice și aminice. Eritropoetina este inactivată de unele proteaze: tripsina, chimotripsina, plasmina (Rosenfeld și colab., 1965) și prin mecanisme imunologice de anticorpi specifici (Schoolley și colab., 1968), ceea ce pledează pentru caracterul polipeptidic al moleculei.

Molecula de eritropoetină pare a fi asimetrică, fiind de 10 ori mai lungă, în raport de lățime (Berry și Waldmann, 1963; Rosse și colab., 1962). Oarecare asimetrie se datorește gradului de hidratare mărit a componentei glucidice, care reprezintă 30%. Spectrul de absorbție al eritropoetinei purificate (Espada și colab., 1972) prezintă valoare maximă la 278 nm, fiind la fel cu al altor proteine.

Activitatea eritropoetinei poate fi separată în mai multe componente prin tehnici care fracționează moleculele cu sarcină electrică diferită. Dacă se aplică însă tehnici de fracționare în raport de dimensiunile moleculelor, se obține o singură componentă activă (Espada și colab., 1974). Este și acesta unul din motivele care fac purificarea sa dificilă.

Compoziția eritropoetinei în acizi aminați la fel a fost studiată, sub rezerva gradului de puritate a eritropoetinei de Espada și colab. (1972) pe o eritropoetină urinară umană cu activitate specifică de 8000—10.500 U/mg.

Predomină în lanțul peptidic acizi aminați cu caracter acid, care, împreună cu acidul neuraminic, conferă moleculei un punct izoelectric coborît (pH 3.8).

Greutatea moleculară a eritropoetinei. Pentru evaluarea greutății moleculare a eritropoetinei, efectuată în laboratorul nostru de Vasile Al. Vasile (1971), a fost utilizat un extract de ser anemic de iepure purificat de 900 X, cu tehnica descrisă anterior (cromatografierea pe DEAE-celuloză și apoi filtrarea în gel de DEAE Sephadex a pseudoglobulinelor F II Dubert). Evaluarea greutății moleculare s-a făcut față de următoarele proteine standard: oval-



TABELUL IV

ETAPELE ȘI GRADUL DE PURIFICARE A ERITROPOETINEI PRIN PRECIPITARE CU METANOL, DIALIZĂ, CROMATOGRAFIE ȘI GELFILTRARE

<i>Procedeu de extragere</i>	<i>Material activ obținut</i>	<i>Grad de purificare</i>	<i>Activitate specifică U/mg</i>	<i>Activitate recuperată</i>
Precipitare fracționată cu metanol	F II α_1 α_2 β_2 globuline	30	0,4	100%
Electrodializă FII	α_1 , α_2 pseudoglobuline	180	2,4	100%
Cromatografie DEAE	α_1 pseudoglobuline	700	12	65%
Adsorbție DEAE	α_1 pseudoglobuline	300	3,2	80%
Cromatografie DEAE sephadex	α_1 pseudoglobuline	2300	33	65%
Filtrare gel sephadex	α_1 pseudoglobuline	35000	160	40%

bumină Serva 5 $\times$ crist. (11.480), mioglobină Fluka 2 $\times$ crist. (459.378), citocrom c NBC Serva, feritină Serva 2 $\times$ crist. (21319), RISA, polivinilpirolidonă prin filtrare în gel de Sephadex G-150 Medium (860), Pharmacia Uppsala. Gradul de purificare a eritropoetinei fiind, în preparatul analizat, relativ redus, deci cantitatea cromatografiată exprimată ponderal, neidentificabilă ca atare, fracțiunea a fost testată exclusiv sub raportul activității biologice. Aceasta s-a evaluat pe șoareci policitemici posthipoxici (0,5 atm, 16 ore zilnic, timp de două săptămâni) prin procentul de incorporare a ^{59}Fe .

S-au utilizat coloane de sticlă 3/85 cm, siliconate în prealabil. Operațiile s-au efectuat la 10°C, debitul tamponului de eluție (Tris 0,01 M, pH 7,35 0,150 NaCl) fiind menținut cu o pompă peristaltică la 12,56 ml/oră. Efluentul era colectat în fracțiuni de câte 2 ml.

Feritina a fost utilizată pentru măsurarea volumului extern (Ve), iar ^{131}I Na pentru volumul total (Vt). Proteinele standard

au fost cromatografiate separat, cu măsurarea simultană a celor două volume.

Din cele trei valori (V_e , V_t și V_o), aplicînd formula lui L a u - r a n t și K i l l a n d e r, s-a calculat:

$$K_{aw} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

pentru fiecare moleculă. Reprezentarea grafică a valorii K_{aw} , în raport de logaritmul greutății moleculare a proteinelor standard dă o dreaptă, cu un coeficient de semnificație $r = 0,987$. Pe aceasta valoarea K_{aw} pentru eritropoetina din ser de iepure este 0,302—0,312 ceea ce corespunde prin interpolare unei valori a greutății moleculare de 58—60.000. Pe baza acestei valori, raza medie a moleculei de eritropoetină, poate fi calculată la 32—32,7 Å. Valoarea este identică cu cea stabilită de L u k o w s k y și P a i n t e r în 1968 (60.000 pentru eritropoetina umană și de oaie).

CARACTERISTICI ANTIGENICE ALE ERITROPOETINEI

Schooley și Garcia (1962), Goldwasser și colab. (1962), Lange și colab., au demonstrat producerea de anticorpi precipitanți față de eritropoetina heterospecifică.

Serul imun antieritropoetină neutralizează eritropoetina *in vivo* cît și *in vitro*. Astfel *in vivo*, administrarea serului imun homo- și heterospecific determină o deprimare a eritropoezei, chiar și atunci cînd aceasta este stimulată prin hipoxie sau hormoni. La animalele utilizate pentru prepararea serului imun antieritropoetină s-a constatat o anemie severă în perioada de creștere a titrului anticorpilor, apărută ca o consecință a neutralizării eritropoetinei proprii. Utilizînd anticorpi fluorescenți antieritropoetină s-au adus argumente pentru prezența acestora în celulele glomerulului renal (F i s h e r și colab., 1968).

Întrucît, nu s-a obținut încă suficientă eritropoetină pură, pentru îndepărtarea anticorpilor contaminanți din serul imun, formați față de proteinele balast, Lange și colab., utilizează fixarea lor pe proteinele specifice ale unui ser lipsit de eritropoetină (1971).

Prin testul O v a r y - B i o z z i (injectarea i.d. în pielea spatelui la cobai a serului imun, iar i.v., șase ore mai tîrziu, a eritropoetinei concentrate, împreună cu albastru Evans), Lange ob-

ține în 1968 reacții congestive cutanate, demonstrând prezența anticorpilor sensibilizanți cutanați sau a reaginilor în serul antieritropoetină (1968), iar în anul 1969, evidențiază prezența, în serul imun, a hemaglutininilor.

TESTAREA IMUNOLOGICĂ IN VIVO

Baciu, Dorofteiu și colab. (1968), studiind proprietățile imunogenetice ale eritropoetinei, evidențiate încă de alți autori (Schooley și Garcia, 1962; Goldwasser și colab., 1968, 1971), au constatat, utilizând o eritropoetină purificată de 8000 ori, provenită de la iepure, că imunizarea cobailor cu acest produs generează anticorpi sensibilizanți cutanați.

Evidențierea reaginilor (anticorpi sensibilizați cutanați) s-a făcut prin injectarea de 0,1 cm³ antiser de cobai, strict i.d., unor iepuri albi (în greutate de 1800—2200 g) în regiunea abdominală, epilată prin smulgerea părului înainte de experiență cu 4—6 zile. Serul imun a fost injectat nediluat și în diluții de 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000 și 1/2000. Pentru control s-a injectat, în aceleași diluții, un ser de cobai neimunizat și câte 0,1 cm³ soluție clorurosodică izotonică. La 6—8 ore de la injectarea i.d. s-a administrat albastru Evans în soluție de 2% i.v., în doză de 1,25 cm³/kilocorp. Rezultatele au fost citite după 45 minute de la injectarea colorantului (fig. 22).

Pentru punerea în evidență a reaginilor au fost utilizați iepuri albi, repartizați în trei loturi:

Primul lot martor a fost injectat i.d. cu ser imun, iar i.v. cu albastru Evans.

Al doilea lot a fost în prealabil anemiat cu fenilhidrazină, prin injectare de 2,5 mg/kilocorp, din soluția de 2,5%, timp de două zile, și câte 5 mg/kilocorp încă trei zile. În ziua a șasea s-au efectuat intradermoreacțiile.

Lotul trei a conținut iepuri care au fost expuși pentru perioade de timp de 4, 6, 8, și 12 ore la hipoxie hipobarică (altitudine simulată de 5500 m). Injectarea i.d. a diluțiilor de anticorp s-a practicat înainte cu șase ore de la injectarea i.v. a albastrului Evans; excepție a făcut lotul expus opt ore la hipoxie, la care intervalul de timp între injectarea i.d. și i.v. a fost de opt ore. La toate loturile, albastrul Evans a fost administrat după întreruperea hipo-

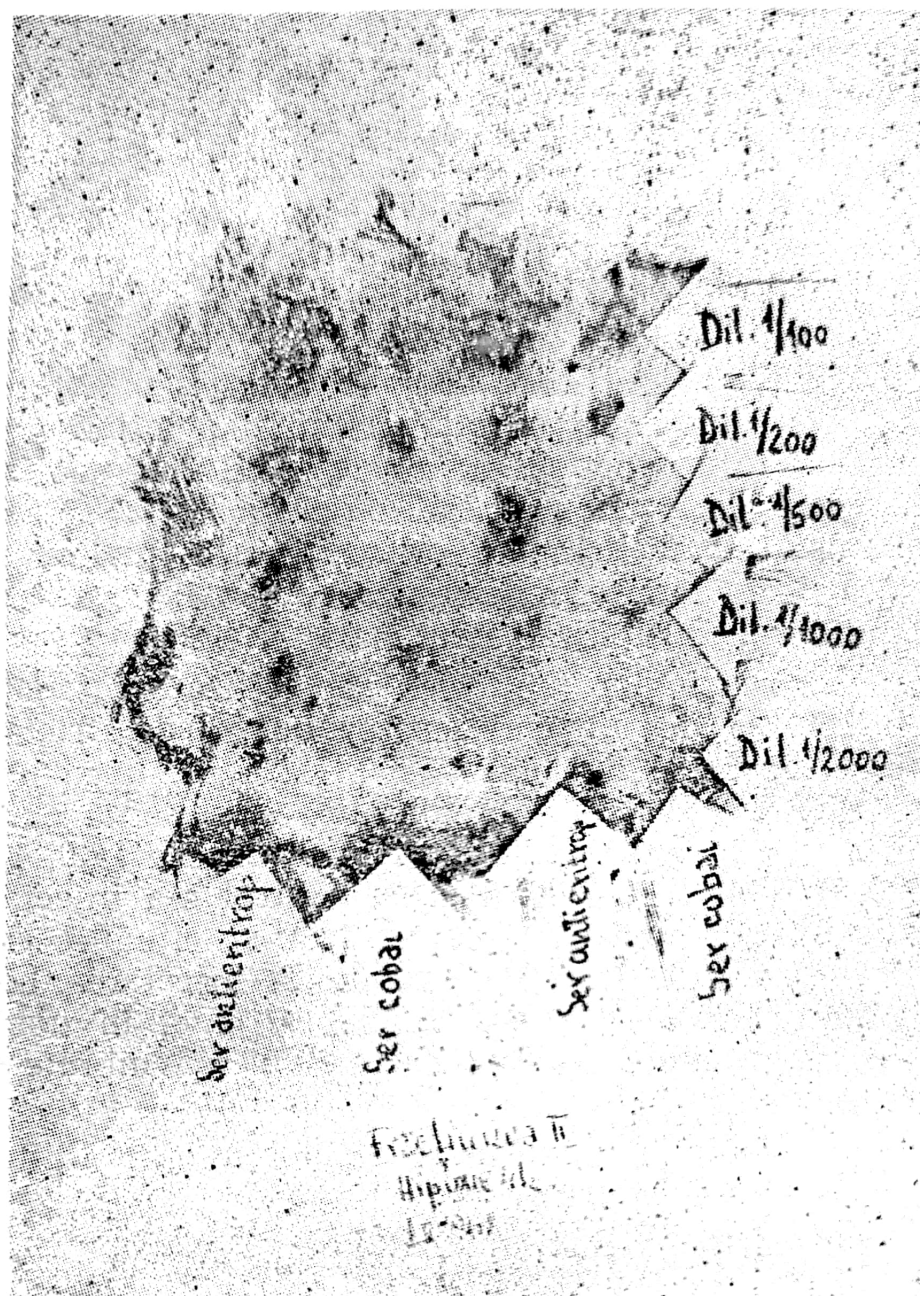


Fig. 22. Evidențierea eritropoetinei prin testul de anafilaxie pasivă cutanată.

xiei. Reacția a fost considerată pozitivă ori de câte ori diametrul zonei de congestie atingea 1 cm.

La lotul de iepuri martori, n-au putut fi observate reacții cutanate pozitive.

Iepurii tratați cu fenilhidrazină au prezentat reacții congestive, cu diametrul peste 1 cm, pînă la diluția de 1/200 a serului imun, pe cînd la serul martor, numai la diluția de 1/10 (diluțiile serului imun n-au depășit 1/2000).

Dintre iepurii expuși la hipoxie, numai cei care au staționat 4 sau 6 ore la presiunea atmosferică de 380 mmHg au prezentat reacții congestive cu diametrul de peste 1 cm, pînă la diluția serului imun de 1/500. La serul de cobai lipsit de anticorpi (martor), au putut fi observate reacții congestive cu diametrul de 0,5 cm, pînă la diluția de 1/200. Chiar și hipoxia de două ore este urmată de apariția reacțiilor congestive, la serul imun, însă cu diametrul sub 0,5 cm, pînă la diluția de 1/500. În cursul hipoxiei hipobarice de 8 sau 12 ore, n-au apărut reacții cutanate nici la serul imun, nici la cel de cobai.

Utilizarea testării imunologice i.d. permite deci urmărirea dinamicii secreției de eritropoetină în cursul expunerii iepurilor la hipoxie. Reacții congestive nete, comparativ cu martorii, fără a depăși însă diametrul de 0,5 cm apar încă după două ore de expunere. Reacțiile devin pozitive după patru sau șase ore de hipoxie. La 8—12 ore reacțiile pozitive nu mai apar, ca și cînd eritropoetina ar dispărea din circulație.

Pot fi considerate specifice pentru eritropoetină reacțiile cutanate, care apar la diluția serului imun de 1/500, la care serul de cobai (martor) nu produce reacții.

Într-un model experimental efectuat pe cîini, cărora li s-a practicat drenarea limfei în timpul expunerii la hipoxie normobarică, s-a stabilit că în limfa animalelor eritropoetina este evidențiable în cantități maxime în primele patru ore de expunere, iar după opt ore, titrul eritropoetinei revine la valorile inițiale (Baciu și colab., 1970).

La rezultatele asemănătoare au ajuns Gurney și colab. (1958), care găsesc o creștere netă a eritropoetinei la animalele expuse patru sau opt ore la hipoxie, Cantor și colab. (1962; 1969) detectează la șobolani o creștere a eritropoetinei plasmatică, după două ore de hipoxie, creștere care se menține 10 ore, apoi diminuează în jurul celei de a 15-a ore și reprezintă o nouă sporire după 22,5 ore de la începutul hipoxiei.

Evidențierea unor cantități minime de eritropoetină, după două ore de hipoxie, atrage atenția asupra unei perioade de latență în elaborarea factorului eritropoetic, sub influența hipoxiei. Este probabil intervalul necesar activării sistemelor proteazice renale și de altă proveniență, cu rol în eliberarea eritropoetinei din profactorul seric. Dispariția din circulație se poate explica prin consumarea eritropoetinei de către celulele sușe și eritroide, angajate în diviziune, sau prin diminuarea producerii ei. Timpul de înjumătățire scurt, de 25 min—1 oră pledează pentru posibilitatea dispariției eritropoetinei prin consum. Este de remarcat că la administrarea

repetată de fenilhidrazină, cu producerea unei anemii marcate (hematocrit în jurul lui 15%, reticulocitele peste 95%), titrul eritropoetinei endogene a fost găsit la valori superioare celui provocat de hipoxia hipobarică, iar secreția de eritropoetină continuă și în ziua a șasea de la începerea administrării agentului hemolitic.

TESTAREA IMUNOLOGICĂ IN VITRO

Este de menționat că *in vitro* se testează și efectul eritropoetinei desializate, care este inactivă *in vivo*. De fapt neuraminidaza sau hidroliza acidă inactivează eritropoetina *in vivo* (Dukes și colab., 1970), efectul rămânând nealterat *in vitro* (Goldwasser și colab., 1971).

Reacții de precipitare. Primele cercetări (Lange și colab., 1962, Schooley și Garcia, 1965) nu au putut demonstra caracterul precipitant al antiserurilor obținute față de eritropoetină, la un grad de purificare puțin avansat, fie că apăreau prea multe linii de precipitare în testul Outcherlony de difuzie în gel, sau la imunelectroforeză, fie că după absorbția serului nu se mai forma nici o linie de precipitare.

Baciu, Dorofteiu și Olteanu (1971), Lange și McDonald (1971), Lange și colab. (1973), apoi Pavlovic-Kentera și colab. (1973) au obținut seruri antieritropoetină, care formează linii de precipitare cu eritropoetina.

Tehnicile de precipitare, necesitând cantități mai mari de eritropoetină, deci material biologic în cantitate mai mare, precum și antiser, încă dificil de preparat, purificarea eritropoetinei nefiind încă satisfăcătoare în cantitățile necesare, tehnica a fost utilizată pentru a detecta heterogenitatea eritropoetinei, diferența între eritropoetina serică și urinară, precum și între eritropoetinele diferitelor specii (Pavlovic-Kentera 1973), ca și în aprecierea purificării eritropoetinei. Reacția de precipitare constituie principiul testării radioimunologice.

Baciu și colab. (1968, 1971), cu un ser imun, obținut la cobai atît față de eritropoetina purificată de 800 ori cît și de eritropoetina crudă de iepure anemiât cu fenilhidrazină, au arătat la imunelectroforeza, efectuată cu serul de cobai, antieritropoetină purificată, că serul de iepure normal, lipsit de eritropoetină, dă două linii de precipitare. Eritropoetina purificată prezintă o singură linie subțire, situată în altă zonă decît liniile de precipitare față de serul

normal și un precipitat destul de dens, mai difuz, situat lângă punctul de start, care ar putea corespunde eritropoetinei. (Fig. 23). Față de serul imun de cobai antieritropoetină crudă, la imuno-electroforeză se obțin numeroase linii de precipitare, atât la eritropoetina crudă de oaie cât și la cea de iepure.

Utilizînd serul antieritropoetină crudă pentru imuno-electroforeza eritropoetinei în diferitele stadii de purificare, se constată dispariția progresivă a unor linii de precipitare, pe măsura înlăturării proteinelor de balast.

Serul imun antieritropoetină crudă, cu anticorpii contaminanți, fixați anterior pe proteinele serului normal (L a n g e), pus în contact cu eritropoetina (provenită de la iepure), în prealabil purificată, prezintă în aceeași regiune și la contactul dintre el și eritropoetina crudă căreia i s-au îndepărtat proteinele de balast (prin precipitarea lor cu ajutorul unui ser imun față de un extract de ser policitemic de iepure) o aceeași linie de precipitare ce corespunde aceleiași proteine. Deci, eritropoetina utilizată ca antigen a generat în serul imun anticorpi precipitanți.

Existența în eritropoetina purificată de 8000 ori a unei zone de precipitare mai extinsă lângă punctul de start, pe lângă linia subțire de precipitare a eritropoetinei, un indiciu al necesității purificării în continuare a extractului, precum și a incertitudinii că greutatea moleculară a eritropoetinei, ca și alte proprietăți, s-ar putea datora excesului acestei proteine balast (B a c i u și colab., 1970).

Geneza anticorpilor precipitanți, sub acțiunea antigenică a eritropoetinei, a fost susținută de G o l d w a s s e r și colab. în 1963 și de B o i v i n în 1966. K r u g e r s D a g n e a u x și colab. (1968) reușesc să obțină un ser imun, care produce la imunodifuziune o singură linie de precipitare cu eritropoetina de om, șobolan sau iepure. Spre deosebire de serul de om normal, la care linia de precipitare apare la o diluție de $1/4$, la bolnavii cu anemie aplastică, linia de precipitare se evidențiază și la diluții de $1/256$. Ea a fost contestată de L a n g e (1968). Prin investigațiile noastre expuse aici, reprezentînd modalități diferite de analiză imuno-electroforetică, rezultă capacitatea eritropoetinei heterogene specifice de a genera anticorpi precipitanți. Precizarea are nu numai importanță teoretică ci și aplicativă, în utilizarea procedeului pentru testarea gradului de purificare.

Testul de hemaglutinare și inhibiție a hemaglutinării. L a n g e și colab. (1969) au arătat că în molecula de eritropoetină sînt prezenți cel puțin doi determinanți antigenici. Unul este implicat în



producerea anticorpilor neutralizanți antieritropoetină, iar al doilea stimulează formarea anticorpilor neneutralizanți, care se adsorb pe eritrocite, producând hemaglutinare. Din aceste două categorii numai anticorpii neneutralizanți sînt specifici pentru eritropoetină putînd fi utilizați la testarea imunologică. Deci în testarea sa imunologică e necesar să se facă aprecierea anticorpilor neneutralizanți.

Antiserul antieritropoetină, conținînd atît anticorpi neutralizanți cît și neneutralizanți față de eritropoetină, poate fi adsorbit în mod exhaustiv pe eritrocite sensibilizate la eritropoetină, în așa fel că, în final, acest ser nu mai aglutinează eritrocitele indicator, dar își păstrează capacitatea de neutralizare.

Efectuarea testului de hemaglutinare și inhibiție a hemaglutinării, publicat în detaliu de Lange și colab. (1969, 1970) și de Lange (1971, 1973), necesită următoarele produse biologice:

- ser antieritropoetină, de mare specificitate, capabil să aglutineze eritrocitele sensibilizate cu eritropoetină;
- eritrocite indicator, sensibilizate cu eritropoetină;
- material de testat și pentru evaluarea eritropoetinei standard.

În principiu, dacă sînt incubate împreună eritrocitele indicator și antiserul hemaglutinant antieritropoetină se produce aglutinarea. Dacă însă, antiserul antieritropoetină este incubat cu preparat standard de eritropoetină sau cu material de testat, înainte de a adăuga eritrocitele indicator, hemaglutinarea este inhibată.

Curbele de inhibiție obținute cu eritropoetina standard, permit calcularea, din materialul de testat, a titrului eritropoetinei.

Cu tehnica de inhibare a hemaglutinării, Lange și colab. (1972), pe 195 seruri normale testate, găsesc o valoare a eritropoetinei de 37 ± 22 mU, de fapt între 7 și 30 mU/1 ml.

Compararea tehnicii de dozare prin inhibarea hemaglutinării cu testări biologice pe șoareci policitemici a eritropoetinei urinare la subiecți normali și la bolnavi (Lange și colab., 1972) a arătat rezultate, în general, concordante.

Dozarea radioimunologică. Dozarea radioimunologică a eritropoetinei a fost efectuată pentru prima dată de Fisher și colab. (1970, 1971, 1972). În acest scop, au utilizat o eritropoetină avansat purificată, cu o activitate specifică de 8300 U — 12.000 U/mg proteină. Sensibilitatea metodei s-a dovedit satisfăcătoare pentru a aprecia, 0,001 U de hormon. Dozări radioimunologice a mai efectuat Lertora și colab. (1973), Garcia și colab. (1977).

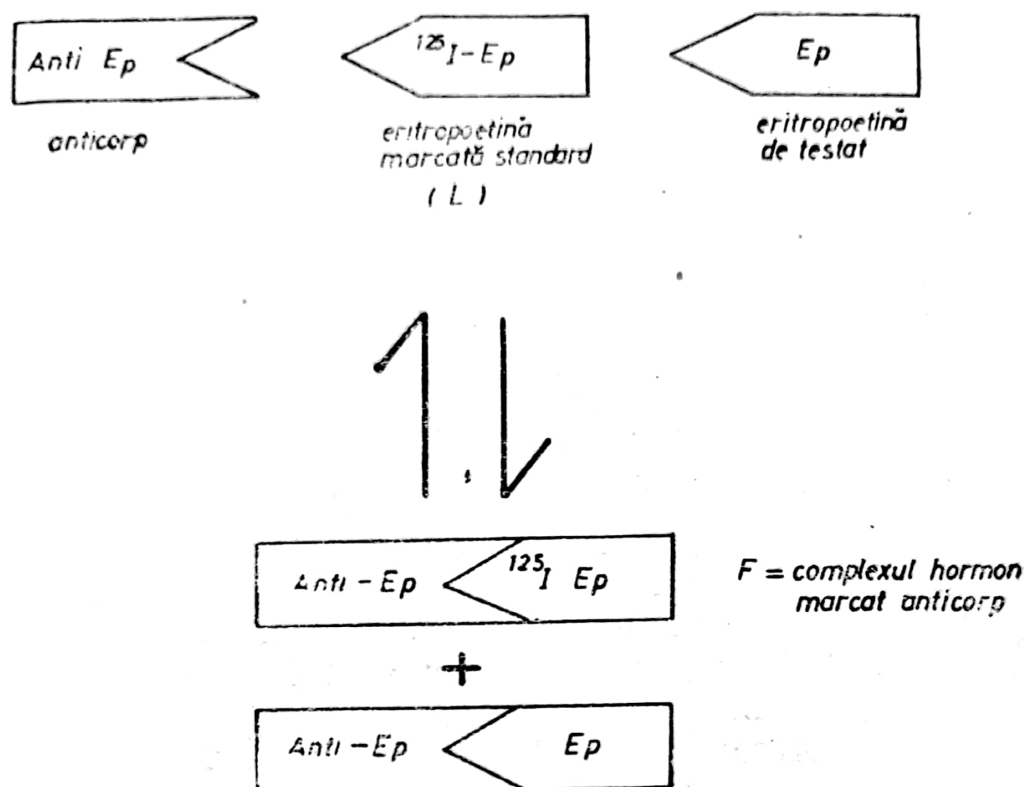


Fig. 23. Reacția de radioimunotestare a eritropoetinei.

Metoda de testare radioimunologică se fundamentează pe competiția între hormonul proteic marcat radioactiv (cunoscut), față de cel nemarcat, în domeniul zonei specifice de reacție cu anticorpul. Cu cât mai mare este concentrația hormonului nemarcat, din materialul de testat, cu atât se va fixa pe anticorpi o cantitate mai mică de hormon marcat. După izolarea (separarea) hormonului fixat de cel liber, se măsoară radioactivitatea fracțiunilor. Schematic reacția se desfășoară în felul următor (Fig. 23):

$$\text{Raportul: } \frac{F \text{ (eritropoetină marcată } ^{125}\text{I, fixată pe anticorp)}}{L \text{ (eritropoetină marcată, liberă)}}$$

permite calcularea concentrației eritropoetinei de testat.

Pentru a se produce reacția antigen-anticorp, serul se incubează la temperatura de 4°C timp de 4—5 zile. Așa cum s-a arătat în situația în care serul testat conține mai mult proteohormon, se va lega de anticorpi o cantitate mai mică de hormon marcat. După aceea, utilizând sisteme adecvate de fracționare (centrifugare, cromatografie pe schimbători de ioni, electroforeză etc.) se separă hormonul marcat, rămas liber în soluție, de hormonul fixat pe anticorp și se stabilește raportul dintre cele două fracțiuni. Se construiește o curbă de etalonare cu ajutorul căreia, după raportul

stabilit, se poate citi direct concentrația de hormon în materialul de testat.

Deci, pentru efectuarea unei testări radioimunologice a eritropoetinei, ca de altfel pentru a oricărui alt proteohormon, sînt necesare următoarele condiții esențiale:

1. Posibilitatea obținerii eritropoetinei într-o formă pură și posibilitatea marcării sale radioactive;
2. Posibilitatea de a obține anticorpi specifici față de proteina pură;
3. O tehnică pentru separarea cantitativă exactă a proteohormonului legat de anticorp și rămas liber după o perioadă dată de incubare.

De subliniat că pentru eritropoetină, deși proteohormon cu bună antigenitate, primele două cerințe sînt foarte dificil de realizat, date fiind dificultățile de a o obține în cantități suficiente pentru aceste operații, cît și cele de purificare totală. Redăm după Fisher și colab. (1977) tehnica radioimunodozării eritropoetinei.

Eritropoetina, cît mai avansat purificată, este marcată cu ^{125}I , după tehnica cu cloramină T a lui Greenwood și colab. (1963). Eritropoetina marcată, cu proprietăți imunoreactive este separată de eritropoetina marcată, dar nereactivă, precum și de cea nemarcată și nereactivă, prin fracționare pe Sephadex G-150. Cea mai mare parte a proteinei marcate este totuși nereactivă sub raport imunologic. Ea e probabil reprezentată de eritropoetina marcată integră și denaturată, alături de eritropoetina nemarcată. O problemă esențială este de a izola din acest amestec eritropoetina marcată integră, nedenaturată, cu reactivitate imunologică păstrată. Garcia (1972) a realizat aceasta prin imunopurificare, iar Fisher și colab. prin electroforeză pe hîrtie Whatman 3 MM în tampon de fosfat 0.05 M.

Fisher și colab. (1977) au utilizat mai tîrziu și alte procedee, mai perfecționate de marcarea cu ^{125}I după Bolton și Hunter (1973) și de fracționare pe Sephadex G-150 și apoi G-100, pentru a obține agregate de eritropoetină, care apar în primul vîrf de eluție, care prezintă atît imunoreactivitate, cît și activitate biologică.

Serul antieritropoetină a fost preparat pe iepuri injectați i.d. cu suspensie de eritropoetină umană urinară, în adjuvant Freund complet, după tehnica descrisă de Lertora și colab., 1975.

Pentru evaluarea rezultatelor se stabilește linia de regresie doză-răspuns, față de preparatul internațional de referință pentru eritropoetină. Autorii au publicat în altă parte descrierea amănunțită a tehnicii (Lertora și col. 1975).

Studii de laborator asupra testării radioimunologice a eritropoetinei urinare umane a mai efectuat Garcia (1972, 1974), iar Cotes (1973) asupra eritropoetinei de oaie.

La cinci subiecți umani adulți, normali sub raport hematologic, Fisher și colab. (1975) găsesc valori între 52—84 mU/ml ser.

NEUTRALIZAREA ACTIVITĂȚII BIOLOGICE A ERITROPOETINEI CU ANTISER IMUN

Schooley și Garcia (1962) au arătat că antiserul, obținut la iepure față de eritropoetina urinară umană, neutralizează efectele acesteia dacă ambii produși sînt administrați *in vivo*. Autorii citați (1965, 1968) au demonstrat că efectul de inhibiție este interacțiunea între eritropoetina antigen și anticorpii imuni și că prin disocierea complexului antigen/anticorp se poate obține eritropoetină activă (Garcia și Schooley, 1971). O cantitate de 1 ml ser imun neutralizează obișnuit 25 IRP unități de eritropoetină umană, prin imunizarea cu eritropoetină purificată, ajungîndu-se la un titru de 300 U/ml ser imun, obținut la iepure. Obișnuit serul antieritropoetină umană abolește activitatea eritropoetinei endogene la șoarece, cobai și șobolan (Schooley, 1979), ceea ce indică diferențe mici în structura eritropoetinei diferitelor specii.

Este importantă posibilitatea producerii la șoarece a unei aplazii medulare eritroide prin injecții repetate de ser antieritropoetină umană.

Cu ajutorul serului antieritropoetină, Schooley (1977) a clarificat o serie de mecanisme relativ la producerea și efectele hormonului.

LOCUL DE PRODUCERE ȘI MECANISMUL DE FORMARE A ERITROPOETINEI

ROLUL RINICHIULUI

Jacobson, Goldwasser, Fried și Plzak, în 1957, au arătat că nefrectomia dublă la șobolani în anoxemie sau tratați cu Cl_2Co sistează secreția de eritropoetină. Ligatura ureterelor modifică foarte puțin reacția eritrocitară la hipoxie (1958). La scurt timp, experimentând pe cîini, Naets publică rezultate asemănătoare (1958). Prin perfuzia rinichiului izolat în condiții de hipoxie, Kuratowska, Lewartowski și Michalak (1960) notează că extrasul perfuzatului dobîndește proprietatea de a provoca, în urma injectării la șoarece, reticulocitoză semnificativă și creșterea proporției normoblaștilor medulari. Studiind prin același procedeu și alte organe de iepure (ficat, plămîni, splină), autorii citați conchid că numai rinichiul produce factorul eritropoetic (1961).

Takaku, Hirashima și Nakao confirmă rolul rinichiului în secreția de eritropoetină (1962). Provoacă ischemia renală unilaterală la șobolani, autorii japonezi menționați descriu creșterea eritropoetinei în plasmă. Dacă se provoacă hemoragie șobolanilor după secționarea bilaterală a nervilor splanchnici, eritropoetina plasmatică nu mai crește. Ar rezulta că impulsul nervos, plecat de la centrul hematopoetic cerebral la rinichi, pe calea nervilor splanchnici, nu se poate valida din cauza secționării lor. Hirashima și Takaku (1962) au adus și dovezi histologice indirecte pentru secreția eritropoetinei în rinichi. Granulațiile din celulele juxtaglomerulare cresc în condiții de stimulare a eritropoezei (după hemoragie și anemie fenilhidrazinică) sau scad în inhibarea eritropoezei, existînd deci un paralelism între producția de eritropoetină și granularitatea celulelor juxtaglomerulare renale. Dovezi pentru producerea renală a eritropoetinei au fost aduse și de alți autori.

Lipsa eritropoetinei în plasmă și în urina bolnavilor anemici din cursul insuficienței renale (anemie uremică) și prezența ei în alte forme de anemii, asocierea poliglobuliei cu unele tumori re-

nale (hipernefrom), precum și dispariția acesteia după înlăturarea tumorii, constituie probe clinice în plus pentru producerea renală a eritropoetinei.

Opus acestor argumente, care pot fi considerate cât se poate de categorice, există însă alte rezultate experimentale, din care rezultă că nu rinichiul produce eritropoetina. Astfel, Erslev (1956) demonstrează, contrar datelor lui Jacobson (1957), că provocând uremie la iepuri prin nefrectomie bilaterală și realizând la scurt timp o hemoragie, activitatea eritropoetică a plasmei crește. Ligaturarea ambelor uretere la iepurii normali face să dispară după câteva zile și la aceștia, ca și la animalele nefrectomizate, reticulocitoza posthemoragică, datorită produșilor de retenție. După Erslev, cauza inhibării eritropoezei în insuficiența renală nu este lipsa de producere a eritropoetinei, ci produșii toxici de retenție, măduva osoasă continuând a fi activă.

Mirand și Prentice (1957), utilizând metode directe și indirecte de testare a eritropoetinei la iepuri și șobolani nefrectomizați, demonstrează — după expunerea animalelor la hipobarism, sîngerare și după administrare de cobalt — creșterea eritropoetinei în plasmă. Autorii citați remarcă și lipsă de reacție, cu deosebire cînd se utilizează ca donatori de plasmă animale tinere, nefrectomizate. Gallagher, McCarthy și Lange (1960), cercetînd bolnavi cu anemie secundară insuficienței renale, au găsit numai la trei, din 25 de cazuri, creșteri ale eritropoetinei. Administrarea de cobalt, care produce stimulare eritroidă prin secreție de eritropoetină, a fost ineficace însă numai la șase bolnavi. Prin urmare, dacă se reduce secreția de eritropoetină în anemie renală, cobaltul e totuși în măsură să o stimuleze.

Bock și colab. (1962), studiind anemia din insuficiența renală, precizează că în anemia secundară glomerulo-nefritei și pielonefritei, măduva eritropoetică se află în hiperfuncție, cu excepția a 8% din cazuri, anemia datorîndu-se calității inferioare a hematiilor, scăderii fierului plasmatic ($72-93 \mu\text{g}\%$), sintezei reduse de hemoglobină sub influența corpilor fenolici, creșterii concentrației de methemoglobină, precum și tulburărilor de metabolism eritrocitar. Autorii menționați consideră că nu se pot face aprecieri asupra rolului eritropoetinei în anemia renală.

Ulterior, Jacobson și colab. (1959) au reluat, cu metode mai sensibile de testare, cercetările asupra rolului rinichiului în producerea eritropoetinei ajungînd de data aceasta la concluzia că plasma de la șobolanii nefrectomizați, expuși la hipoxie, produce la șoriciei policitemici (foarte sensibili la eritropoetină), comparativ cu martorii, o reacție reticulocitară minimă. Acceptînd și interpreta-

rea după care această reacție s-ar datora eritropoetinei administrate, autorii respectivi discută fie posibilitatea că rinichiul nu produce eritropoetină și că scăderea acesteia, după nefrectomie este rezultatul intoxicației, fie posibilitatea spre care înclină mai mult, anume că eritropoetina produsă în condiții obișnuite, în primul rând în rinichi, după ablația acestora, poate fi generată și de alte organe sub influența stimulului anoxic, un exemplu similar fiind cunoscut în cazul hormonilor produși de gonade.

Pentru a stabili rolul rinichiului în producerea de eritropoetină, Băciu și colab. (1963) au utilizat șobolani cărora li s-a efectuat în doi timpi, la intervale de 14—21 zile, nefrectomie bilaterală pe cale lombară, sub anestezie cu eter. După patru ore de la intervenție, șobolanii au fost expuși în camera barometrică la o presiune atmosferică scăzută, corespunzătoare altitudinii de 5000 m. Din serul recoltat s-au izolat, prin precipitare cu metanol, la rece, pseudoglobulinele fracțiunii II, care conțin fracțiunile electroforetice ale globulinelor α_1 , și α_2 , între ele și eritropoetina, care s-a testat biologic pe șobolani.

Rezultatele arată că expunerea la hipoxie (altitudine 5000 m) timp de 24 ore, este urmată de apariția în sângele circulant a eritropoetinei. Extractul plasmei, testat pe șobolani tineri, produce — comparativ cu martorii — un exprimat efect eritrostimulator (fig. 24).

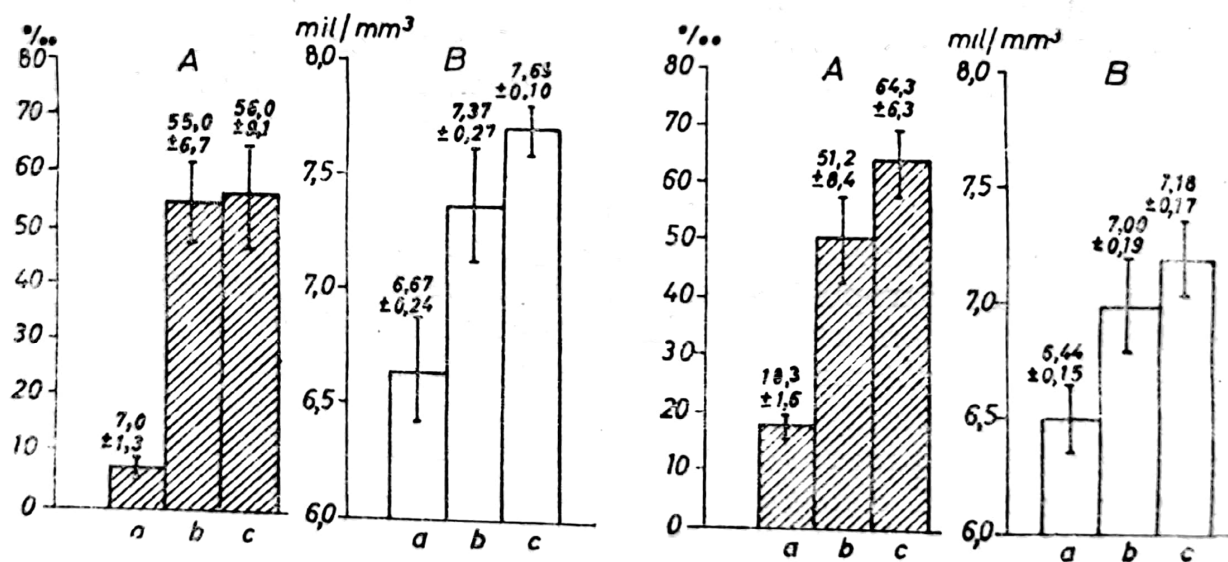


Fig. 24. Reticulocitele (A) și hematiile (B) la șobolanii tratați cu pseudoglobulinele fracțiunii II preparată din serul celor două loturi de animale de control și nefrectomizate bilateral, înainte (a) la 4 zile (b) și la 5 zile (c) după administrare. Stînga: lotul martor (5 animale) expuse 24 ore la hipoxie (altitudine corespunzătoare la 5000 m); dreapta: șobolanii nefrectomizați (16 animale), expuși 24 ore la hipoxie (altitudine corespunzătoare la 5000 m).

Rezultă deci că eritropoetina se secretă și în lipsa rinichiului. Titrul de eritropoetină la șobolani nefrectomizați expuși la anoxie hipoxică este aproximativ egal cu al martorilor. Rezultatele diferite se pot explica prin utilizarea unei eritropoetine lipsită de produșii toxici de retenție din uremie și prin reducerea traumatismului în operația de nefrectomie efectuată pe cale lombară în doi timpi.

Foarte concludente apar rezultatele lui B a c i u și colab. (1963) obținute în cercetări pe cîini, cu izolarea somato-cefalică a circulației și cu transplantarea unui rinichi în regiunea gîtului, celălalt fiind extirpat. Acest model experimental permite provocarea unei hipoxii ischemice cerebrale sau renale la un animal complet restabil.

Modelul realizat asigură, în condiții optime, studiul rinichiului privind secreția de eritropoetină. Prin compresiunea limitată a arterei carotide, ce irigă „capul izolat“, opt ore zilnic, timp de trei zile consecutiv, se realizează hipoxia ischemică sino-carotidiană și encefalică. Stimularea centrilor diencefalo-mezencefalici pe cale reflexă și directă, prin hipoxie, declanșează secreția eritropoetinelor într-un organ care, dacă ar fi rinichiul, după denervare, secreția de eritropoetină trebuie să lipsească. Prezența eritropoetinelor în asemenea condiții indică, bineînțeles, producerea ei în alte organe, dat fiind faptul că rinichiul denervat nu se găsește în hipoxie.

Modelul descris permite efectuarea și a unei hipoxii ischemice numai a rinichiului denervat, prin compresiunea celeilalte artere carotide comune, anastomozată cu artera renală. Compresiunea limitată cu valoarea de 10 mmHg sub nivelul presiunii sistolice, practică opt ore zilnic timp de trei zile consecutiv, reduce la jumătate debitul sanguin. Dacă rinichiul produce eritropoetina prin stimulare directă sau sub acțiunea hipoxiei ischemice, după compresiunea arterei renale este de așteptat să apară reacția eritrocitară, iar în plasmă să se poată testa eritropoetina. Testarea eritropoetinelor s-a făcut la 16 ore după, prin compresiunea renală sau cefalică de opt ore (Fig. 25 a).

Reiese din acestea că hipoxia ischemică cefalică provoacă secreția de eritropoetină și reacția eritrocitară (reticulocitoză și poliglobulie), aducînd în plus precizarea că secreția eritrocitară se produce și dacă rinichiul este transplantat și deci denervat. În fig. 25 b sînt expuse rezultatele uneia din experiențele cu hipoxie ischemică cefalică și ale testărilor de eritropoetină la acest animal.

Dacă se provoacă ischemia rinichiului transplantat, prin compresiunea măsurată a anastomozei arteriale carotido-renale, la

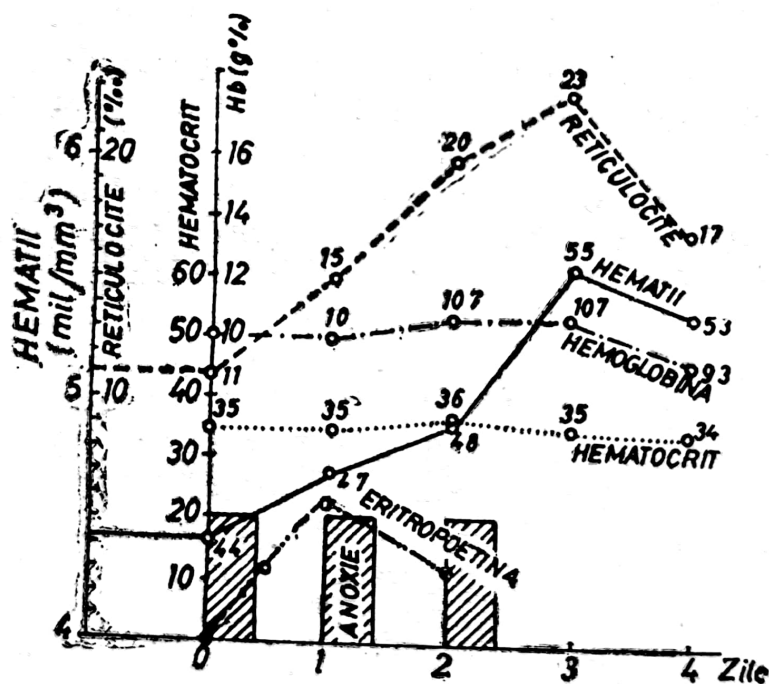
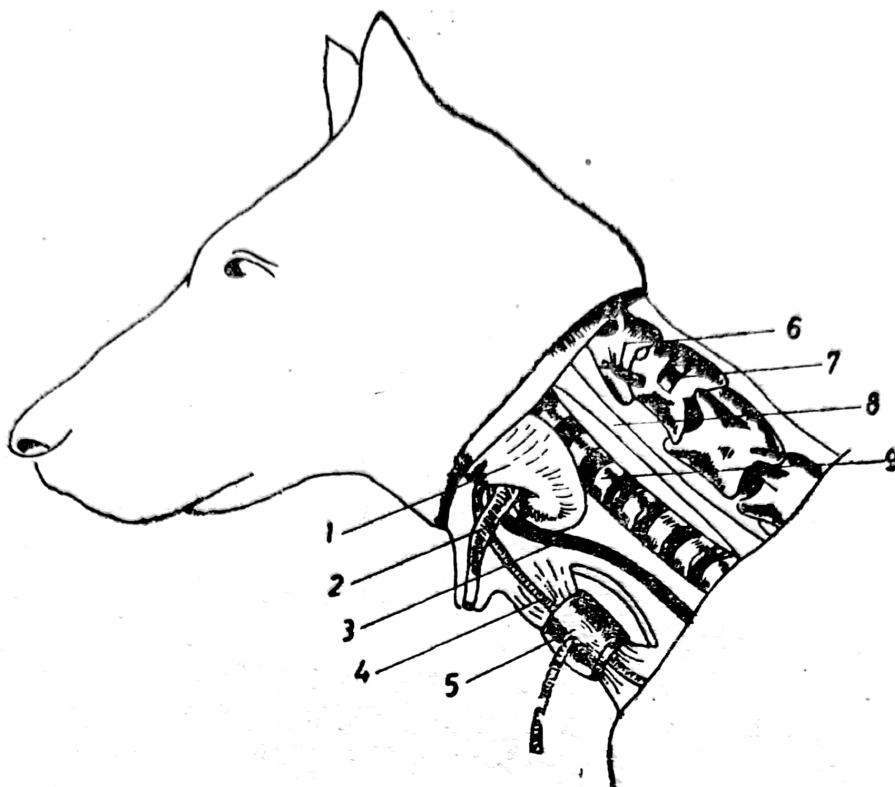


Fig. 25. a. Reprezentarea schematică a animalului cu „cap izolat” cronic și cu transplant de rinichi în regiunea gâtului, celălalt rinichi fiind extirpat. Pentru a produce hipoxie arterială ischemică renală, se comprimă anastomoza carotido-renală timp de 8 ore zilnic, trei zile consecutiv, cu o presiune de 10 mmHg sub valoarea presiunii sistolice.

b. Efectul hipoxiei arteriale ischemice cefalice prin compresiunea carotidei comune care irigă creierul, cu o presiune de 10 mmHg sub valoarea presiunii sistolice, 8 ore zilnic, timp de trei zile, asupra secreției de eritropoetină și a răspunsului eritrocitar la câinele cu „cap izolat” cronic.

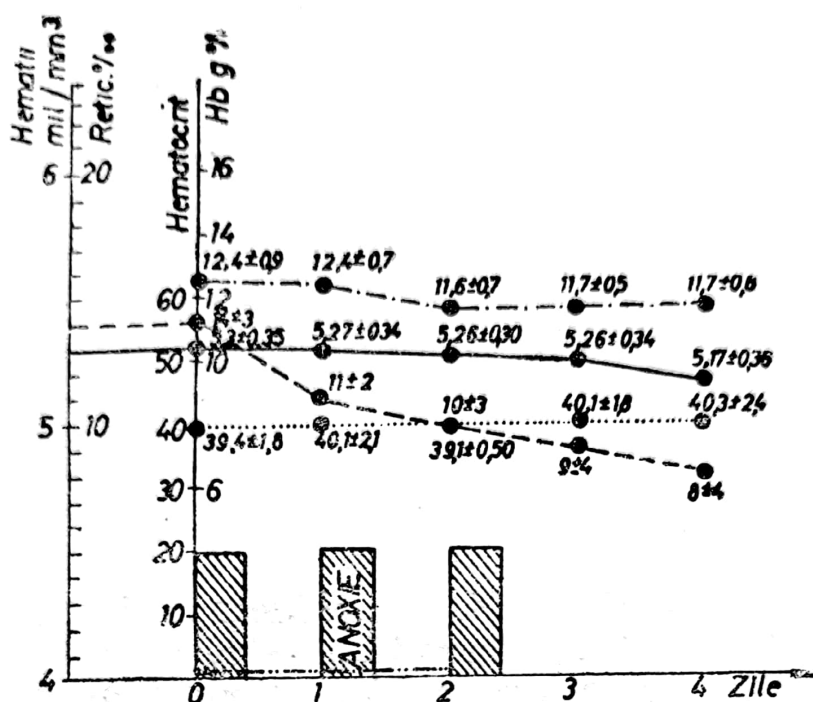


Fig. 25. c. Efectul hipoxiei arteriale ischemice renale prin compresiunea anastomozei carotido-renale cu o presiune de 10 mmHg, sub valoarea presiunii sistolice, 8 ore zilnic, timp de trei zile, asupra secreției de eritropoetină și a răspunsului eritrocitar la câinele cu „cap izolat” cronic. Indicațiile ca în fig. 25 b.

același animal, reacția eritrocitară nu se produce (Fig. 25 c). Hematiile și reticulocitele rămân nemodificate.

Efectul hipoxiei renale directe asupra eritropoezei reiese din rezultatele experiențelor în care s-au efectuat ischemierea rinichiului transplantat, prin compresiunea arterei renale. Lipsa reacției eritrocitare după hipoxia renală, la un animal complet restabilit după intervenția chirurgicală, constituie o dovadă complementară că, la producerea eritropoetinei, participă și alte organe (producere extrarenală). Un răspuns din partea rinichiului, în acest caz, este exclus din cauza denervării și pentru faptul că nu se află în hipoxie.

Din aceste experiențe rezultă că hipoxia cefalică declanșează reacția eritrocitară prin alt organ decât rinichiul denervat în urma transplantării și că hipoxia ischemică renală, la un animal care nu se găsește sub acțiunea stressului chirurgical, nu e în măsură să provoace direct reacția eritrocitară.

Autorii, după opinia cărora rinichiul are rolul principal în secreția de eritropoetină, au găsit că în urma nefrectomiei și a expunerii la hipoxie, capacitatea eritrostimulatoare a plasmei sanguine crește numai în mică măsură sau nu crește deloc. Ei consideră

că ischemia renală, provocată în condiții generale de hipoxie prin vasoconstricție renală sub influența nervilor splanchnici, prin clamparea „in situ” a arterei renale sau prin perfuzia *in vitro* a rinichiului în condiții de hipoxie, constituie cauza secreției de eritropoetină în rinichi. Numai în lipsa rinichilor ar putea interveni compensator, în măsură redusă, și alte organe producătoare de eritropoetină.

SISTEMUL RETICULO-ENDOTELIAL ȘI PRODUCEREA ERITROPOETINEI

Se știe că pentru a declanșa o secreție apreciabilă de eritropoetină trebuie să se reducă concentrația sîngelui arterial în oxigen mai mult de 50%. Or, la acest grad de hipoxie, permeabilitatea capilară și fluxul limfatic ating valori maxime (Maurer, 1940). În fața acestui fapt, Baci u, Dorofteiu, Rosenfeld, Don, Răducanu, Timar (1970) au pus problema dacă procesul de creștere a fluxului limfatic n-ar putea fi în legătură cu elaborarea de eritropoetină în pereții vaselor capilare sau în alte structuri morfologice ale sistemului reticulo-endotelial, situate pe calea de formare și drenare a limfei. În acest scop, cîini anesteziați cu un amestec de uretan-cloraloză și morfină erau puși să respire prin intubare traheală, un amestec de 8—9% O₂ în azot, dintr-un aparat Krogh (fig. 26).

CO₂ din aerul expirat se fixează pe clorura de calciu sodat ca și vaporii de apă și O₂ consumat se completează din butelia anexă pe măsură ce este consumat de animal. Animalele au fost menținute 8 ore în aceste condiții și gradul de hipoxie a fost apreciat după traseul EEG și ECG precum și cu ajutorul unui oxigraf al cărui element fotoelectric a fost plasat pe limba animalului.

La cei șapte cîini supuși la hipoxie hipoxică se constată o poliglobulie pasageră care apare în cursul hipoxiei însăși. Ea poate fi atribuită hemoconcentrației. A treia zi după experiență, animalul prezintă o reticulocitoză marcată ($p < 0.001$) urmată, în ziua a 4-a și a 5-a, de o creștere a numărului de eritrocite ($p = 0,02$) datorită eliberării de eritropoetină în circulație.

Drenajul limfatic nu modifică hemoconcentrația în perioada hipoxică. Totuși, în intervalul de 14 zile consecutiv hipoxiei, reticulocitoza, deși prezentă începînd din ziua a 9-a, nu este semnificativă din punct de vedere statistic. Nu se constată nici o creștere

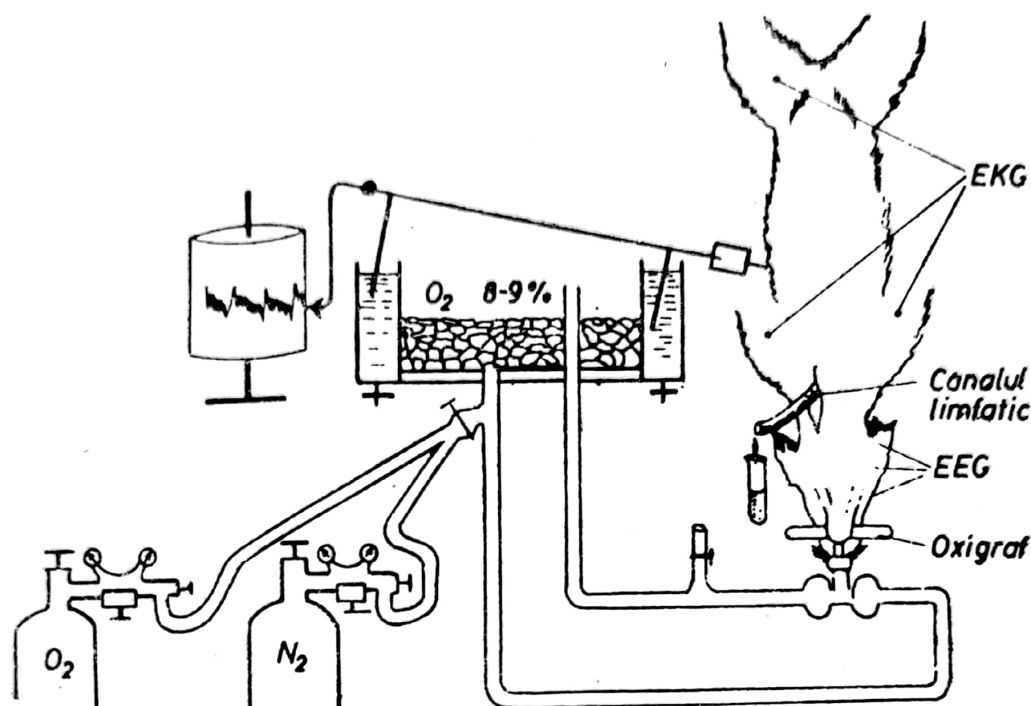


Fig. 26. Reprezentarea schematică a dispozitivului de producere a hipoxiei hipoxice, compus dintr-un aparat Krogh conectat la o butelie de O_2 și una de N_2 . Se reprezintă de asemenea drenajul limfatic, înregistrarea variațiilor consumului de O_2 , EEG, ECG și măsura gradului de oxigenare a sîngelui.

însemnată a numărului de eritrocite. Fenomenul poate fi explicat prin pierderea eritropoetinei sau a unui precursor al factorului eritropoetic în cursul drenării limfei (fig. 27).

Drenajul limfei, pe loturi alcătuite din aceleași animale, arată că răspunsul eritrocitelor caracteristic, al cîinilor martor lipsește dacă se dirijează spre exterior limfa din canalul toracic, în timpul perioadei de hipoxie.

Se poate presupune, după aceste date, că un profactor sau chiar eritropoetina însăși, secretată în celulele sistemului reticulo-endotelial, situate de-a lungul pereților capilari, este eliberată în lichidul intercelular. Urmînd calea limfatică, cale unică prin care substanțele proteice din lichidul interstițial pot ajunge în circulație, profactorul sau factorul activ eritropoetic, este captat în experiențele noastre de drenaj limfatic.

Rămîne de precizat dacă secreția acestui factor este localizată într-un anumit organ, cum ar fi splina sau ficatul, sau dacă este produs de celulele sistemului reticulo-endotelial răspîndite difuz în diverse organe.

Experiențele efectuate de Gordon (1967), Kuratowska (1968), Fisher (1968) și alții au demonstrat că în fracțiunea mitocondrială ușoară și în fracțiunea microzomială a rinichilor

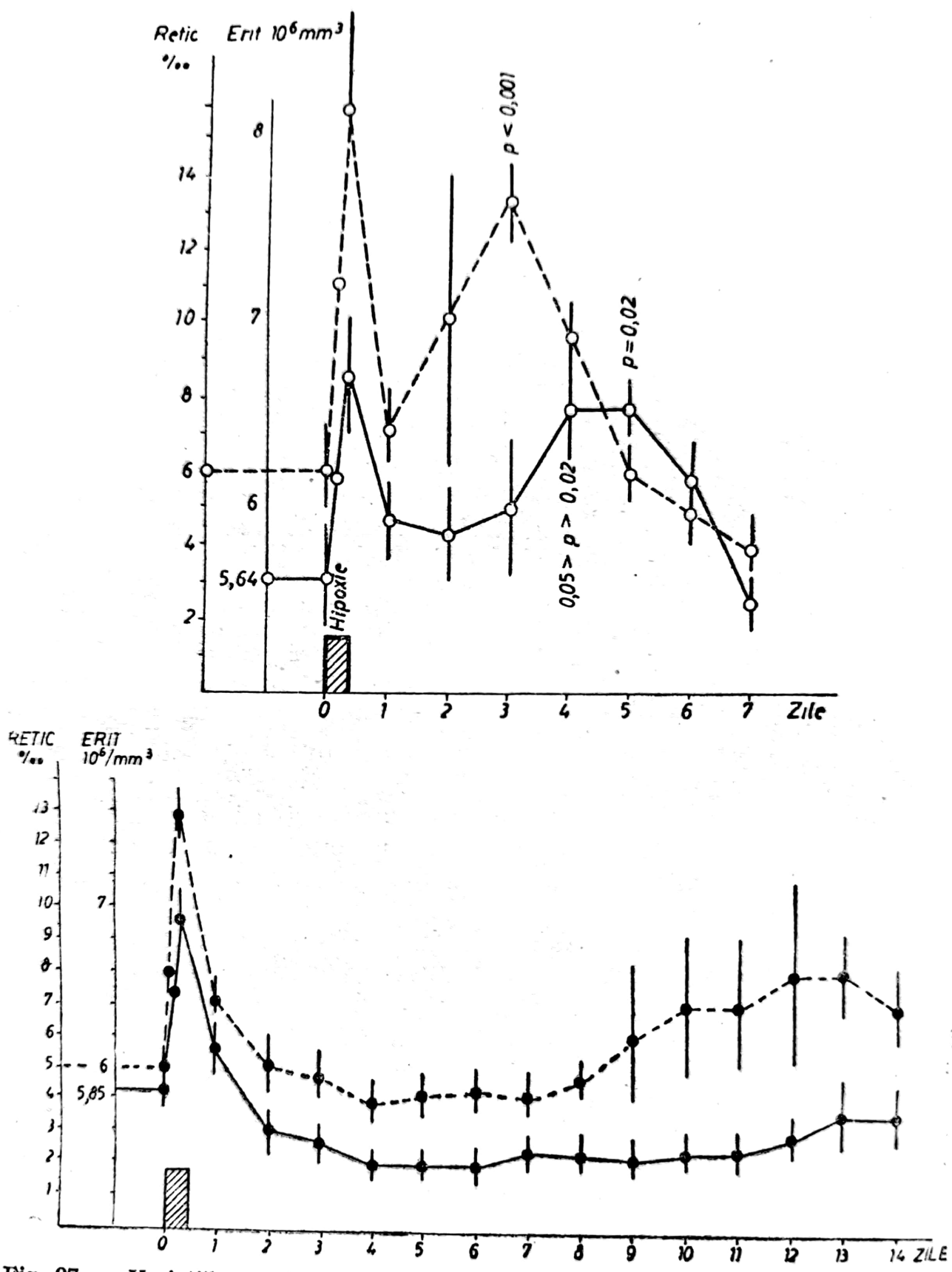


Fig. 27. a. Variațiile numărului de hematii și reticulocite la animale supuse hipoxiei hipobare timp de 8 ore, determinate la începutul experienței și apoi timp de șapte zile. b. Variațiile numărului de eritrocite și a reticulocitelor la mie, la animalele din figura precedentă, cărora li s-a practicat drenaj limfatic în condițiile de hipoxie hipoxică, determinate în ziua experienței, apoi în timpul următoarelor 14 zile.

s-ar elabora în condiții de hipoxie o enzimă: eritrogenina sau factorul eritropoetic renal, care în interacțiune cu un substrat alfa-globulinic plasmatic, eritropoetinogenul sau factorul eritropoetic plasmatic, ar forma eritropoetina activă.

Continuând cercetările privind inhibiția reacției eritrocitare la hipoxie a animalelor cu sistemul reticulo-endotelial blocat, Daniello, Baci, Rosenfeld și Pavel (1971) au urmărit dacă lipsa de răspuns eritocitar la hipoxie, constatată după administrare de cărbune coloidal, se datorește scăderii sau inactivării substratului alfa-globulinic seric, sintezei deficitare de factor renal sau apariției unui inhibitor al eritropoetinei. Cercetările au fost făcute pe șobolani și șoareci. Factorul eritropoetic renal a fost extras din rinichii a 50 de șobolani menținuți timp de 12 ore într-o cameră barometrică la presiunea de 0,5 atm.

În scopul de a obține prin ultracentrifugare fracțiunea mitocondrială ușoară s-a utilizat tehnica lui Gordon și colab. (1967). Pentru a testa activitatea biologică s-a incubat un volum de factor renal cu 10 volume de ser de șobolan, agitând la 37°C timp de 15 min. Un mililitru din acest amestec se administrează imediat prin injectare intraperitoneală șoarecilor utilizați pentru test.

Blocajul SRE a fost efectuat la 100 de șobolani albi adulți Wistar, de ambele sexe, care au primit prin injectare i.v. tuș de China în doză unică de 35 mg/100 g greutate corporală. Animalele erau sacrificate 24 ore după injecție și serul utilizat pentru testări. O parte din animale (50) au fost introduse în camera barometrică la o presiune de 0,5 atm., în intervalul dintre injecția cu tuș de China și sacrificare.

Pentru a elimina inhibitorul eritropoetinei serul a fost dializat timp de 24 de ore față de EDTA 0,005 M și, în sfârșit, 24 ore față de apă distilată.

Testul de activitate eritropoetică al diferitelor materiale biologice a fost efectuat pe șoareci albi nepreparați de ambele sexe, în greutate de 20—25 g. Înainte și în ziua a 3-a, la fel ca și în ziua a 5-a după injectarea extractului, s-a urmărit numărul de hematii, reticulocitele și hematocritul. Toți produșii au fost testați și în ceea ce privește efectul asupra incorporării ^{59}Fe în eritrocitele șoricilor policitemici.

Inducerea policitemiei a fost realizată menținând șoricelii timp de trei săptămâni în camera barometrică la presiune de 0,5 atm. În a treia zi, după ce au fost scoase din barocameră, animalele au primit i.p. produsul de testat într-un mililitru de soluție izotonică; în a 5-a zi li s-a administrat 0,2 μCi ^{59}Fe și în a 7-a zi au fost sacrificate; s-a stabilit procentul de ^{59}Fe incorporat în hematiile circu-

lante. Trebuie menționat că în momentul cînd s-a început testarea, animalele aveau un hematocrit mediu de 56%.

Șoarecii destinați testărilor au fost împărțiți în patru loturi și au primit i.p. (în doză unică de 1 ml) următoarele substanțe:

Lotul I: ser provenit de la animalele cu sistemul reticulo-endotelial blocat incubat cu factor renal.

Lotul II: ser recoltat de la șobolani injectați cu tuș de China și expuși la hipoxie timp de 24 ore; ser incubat cu factor renal.

Lotul III: ser provenit de la animalele cu sistemul reticulo-endotelial blocat, dializat față de EDTA și apă distilată, incubat cu factor renal.

Lotul IV a servit de lot martor, animalele fiind injectate cu ser de șobolan normal, incubat cu factor renal.

Rezultatele obținute sînt prezentate grafic în fig. 28.

Din analiza acestor date se poate reține că animalele din lotul I, tratate cu ser recoltat de la șobolani cu SRE blocat, incubat cu factor eritropoetic renal, după injectarea produsului de testat, răspund prin activarea eritropoezei.

Dimpotrivă, la lotul martor injectat cu ser de șobolan normal incubat cu factor renal, stimularea eritropoezei este evidentă. În ceea ce privește incorporarea ^{59}Fe în eritrocitele șoarecilor policitemici, loturile I, II și III prezentau o incorporare redusă, apropiată de valorile martorilor, în timp ce la lotul IV incorporarea a marcat o creștere semnificativă (13,3%).

Lipsa de activitate eritrostimulatoare a serului șobolanilor injectați cu tuș de China, ar putea fi datorită scăderii elaborării profac-

torului seric, ca efect al blocării SRE. Există și posibilitatea unei perturbări a sintezei factorului eritropoetic renal. În sfîrșit, ținînd cont de experiențele lui Krzymowski și colab. (1964) cu apariția unui inhibitor dializabil al eritropoeticei în urma administrării de coloranți macromoleculari, această eventualitate trebuie la fel să se pună în discuție.

Analizînd rezultatele obținute se poate observa că serul provenit de la animalele tratate cu tuș de China nu prezintă acțiunea eritrostimulatoare nici

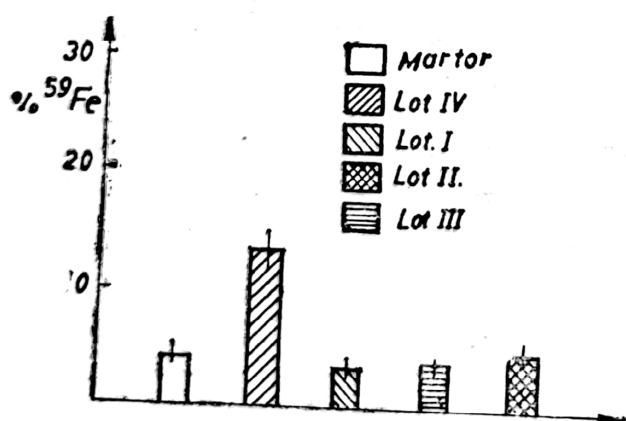


Fig. 28. Incorporarea ^{59}Fe în eritrocitele șoarecilor policitemici posthipoxici. [S-a testat activitatea eritropoetică a serului recoltat de la șobolani cu SRE blocat și amestecat și incubat în diferite condiții experimentale cu REF, în comparație cu lotul martor.

chiar după incubarea cu factorul renal. În aceste condiții expunerea animalelor la hipoxie hipobară nu este urmată nici de creșterea titrului eritropoetinei serice. Întrucât serul șobolanilor normali, incubat cu factorul renal, câștigă proprietăți eritrostimulatoare nete, rezultă că absența răspunsului eritrocitar la hipoxie al animalelor injectate cu tuș de China nu poate fi datorită lipsei factorului renal.

Ținând seamă de posibilitatea inactivării eritropoetinei printr-un inhibitor format în aceste condiții experimentale, am aplicat tehnica de eliminare a sa cu ajutorul dializei. Întrucât nici după dializă serul nu prezintă activitate eritrostimulatoare, în urma incubării cu factorul renal, se exclude intervenția unui factor inhibitor dializabil.

În concluzie, lipsa de activitate eritrostimulatoare a serului șobolanilor tratați cu tuș de China nu este datorată nici reducerii factorului renal, nici intervenției unui inhibitor, ci diminuării sau inactivării profactorului seric al eritropoetinei.

Se poate deci presupune că profactorul eritropoetic seric, eritropoetinogenul, este eliberat de celule ale SRE pe cale limfatică și că secreția lui este inhibată după blocarea SRE. O a doua posibilitate ar fi ca în urma reacției nespecifice la particulele de cărbune, așa cum se întâmplă și în cursul reacției inflamatorii la terebentină (Rosenfeld, 1968) sau a răspunsului imun specific, să se producă, printr-un mecanism încă neclarificat, blocarea formării de eritropoetină, cu reducerea exprimată a răspunsului eritropoetic la hipoxie.

În sfârșit, rămîne de verificat și ipoteza, după care sistemul de macrofage, bogat în enzime lizozomale, nu intervine prin eliberarea unei enzime eritropoetinoformatoare similară sau identică cu factorul renal, sau eventual prin formarea însăși a eritropoetinei în aceste celule, proces ce poate fi blocat prin cărbunele coloidal.

MECANISMUL RENAL DE FORMARE

Fată de ipoteza inițială a formării renale a eritropoetinei (Jacobson, 1957), Kuratowska și colab. (1964, 1968) au susținut că rinichiul nu elaborează eritropoetina ca atare, ci un factor eritropoetic renal, care se găsește în fracțiunea subcelulară nucleară a rinichilor animalelor hipoxice. Acest factor reprezintă precursorul eritropoetinei. Activat de o alfa-globulină plasmatică generează eritropoetina.

Contrera, Zanjani, Gordon și colab. (1968) au arătat, spre deosebire de grupul cercetătorilor polonezi, că factorul eritropoetic renal sau eritrogenina, care poate fi extras din rinichii hipoxici ai rozătoarelor în fracțiunea mitocondrială ușoară, precum și în cea microsomală, este un activator al unei proteine plasmatice denumită eritropoetinogen. Aceasta aparține globulinelor, fiind o alfa₂-macroglobulină sau conținută de aceasta.

Încercările de localizare a producerii eritropoetinei la nivel subcelular i-au permis lui Libbin și colab. (1974) să aducă dovezi pentru proveniența lizozomală a eritrogeninei din rinichiul hipoxic.

Harvey și colab. (1972, 1975), citat de Gordon și Kaplan (1977), au demonstrat că eritrogenina extrasă din rinichii hipoxici reprezintă o protează specifică, de origine lizozomală, a cărei acțiune asupra substratului (eritropoetinogen) este inhibată de Trasylol și acidul epsilon-aminocaproic.

Baciu și colab. (1973) au demonstrat *in vivo* că Trasylolul și acidul epsilon-aminocaproic inhibă răspunsul eritrocitar în cursul expunerii șobolanilor la hipoxie (0,4 atm. 5 ore zilnic, timp de 5 zile) sau în urma unei anemii de 30% greutate corporală. Utilizând lizozomi renali, izolați din rinichi de șobolani hipoxici după Shibko și Tappel (1965), Baciu, Ivanof și colab. (1978) au demonstrat că incubarea extractului *in vitro* cu ser normal de șobolan conferă amestecului proprietăți eritrostimulatoare evidente (Fig. 38).

FORMAREA EXTRARENALĂ

În cercetări experimentale pe șobolani, Baciu, Dorofteiu, Olteanu, Pavel, Daniello (1973) au studiat mecanismele enzimatice extrarenale, care, după datele existente, ar putea interveni în biogeneza eritropoetinei. Davis (1960) a descris încă din anul 1960 creșterea reticulocitelor după administrarea de acetilcolinesterază, care reproduce efectul secreției de eritropoetină, după cum au demonstrat Samuels și colab. (1968). Yen Hoong Loo și colab. (1960) au arătat că anumite proteaze, ca papaina cristalizată și bromelina crudă, activează eritropoeza, dacă sînt injectate parenteral.

Baciu și colab. (1973) au arătat că *in vivo* Trasylolul Bayer (2500 U.I./100 g corp) și acidul epsilon-aminocaproic (Fluka) (1 g/1 kg greutate), inhibă producția de eritropoetină, dacă sînt administrate parenteral înainte de expunerea șobolanilor la hipoxie hipobară

de cinci ore, la 0,4 atm. Pentru control s-a utilizat un lot de șoareci în aceleași condiții, neinjectați, expuși la hipoxie.

Îndată după încetarea hipoxiei hipobarice, din serul animalelor au fost separate pseudoglobulinele care conțin eritropoetina. Testarea activității eritropoetice a pseudoglobulinelor fracțiunii II s-a făcut pe șoareci normali, prin numărarea elementelor figurate și altele pe șoareci policitemici posthipoxici prin măsurarea incorporării ^{59}Fe în eritrocitele circulante.

Hipoxia anemică a fost realizată prin recoltarea unui volum de sânge ce reprezintă 30% din greutatea corporală, cu reinjectarea serului. Administrarea inhibitorilor proteazici s-a făcut în același mod în trei doze, prima înainte de sîngerare, apoi în zilele a 2-a și a 3-a după sîngerare. Răspunsul eritropoetic la cele două loturi, a fost urmărit comparativ cu un lot de control.

In vitro s-a urmărit dacă enzimele cu activitate esterazică și proteazică: acetilcolinesteraza, hialuronidaza și kalikreina, incubate cu profactorul eritropoetic seric, sînt în măsură să elibereze eritropoetina activă. Într-o primă serie de experiențe, efectul eritropoetino-eliberator al acestor enzime a fost studiat comparativ cu factorul eritropoetic renal.

Factorul renal a fost preparat după Gordon și colab. (1971) din fracțiunea mitocondrială ușoară a rinichilor de șobolani hipoxici.

Serul anemic de șobolan nefrectomizat, ca sursă de profactor eritropoetic, lipsit de factor renal a fost obținut de la șobolani anemizați cu fenilhidrazină, prin injectări intramusculare, timp de cinci zile, după care erau nefrectomizați și sîngerați la 48 ore după nefrectomie.

Activarea profactorului eritropoetic din serul anemic s-a efectuat prin incubarea acestuia în proporție de 10 : 1 cu extractul renal, sau cu cantități de enzime exprimate în unități pe 1 ml ser. Durata incubării a fost de 15 min la 37°C.

Fără a fi inactivat, îndată după incubare, amestecul a fost injectat șoarecilor policitemici posthipoxici, pentru testarea activității sale eritrostimulatoare în raport de înglobarea ^{59}Fe în eritrocitele circulante.

În altă serie de experiențe, profactorul eritropoetic a fost obținut în serul recoltat de la șobolani expuși timp de cinci ore la hipoxie hipobarică (0,4 atm.), după tratament prealabil cu acid epsilon-aminocaproic, în dozele și în condițiile arătate. Prin aceasta s-a urmărit blocarea utilizării profactorului în procesul de formare a eritropoetinei.

Serul a fost incubat în aceleași condiții cu hialuronidază N.B.C., în două doze, precum și cu acetilcolinesterază Schuchardt.

După incubare, hialuronidaza din amestec a fost inhibată cu heparină în proporție de U la U, iar acetilcolinesteraza prin încălzire 30 min la 56°C.

Comparativ cu serul integral, au fost supuse acțiunii enzimatice și fracțiunile acestuia, I-a conținând β_2 și gama-globulinele, iar a II-a alfa și β_1 -globulinele.

Testarea activității eritropoetice s-a făcut pe șoareci NMRI, cărora li s-a injectat, timp de trei zile consecutiv, i.m., preparatul în doză totală de 20% din greutate, în raport cu creșterea reticulocitelor și eritrocitelor, în zilele 4 și 5 după prima injecție.

Reacția eritrocitară posthemoragică este inhibată, pe durata administrării, de Trasylol și acid epsilon-aminocaproic.

Blocarea formării de eritropoetină sub acțiunea Trasylolului sau a acidului epsilon-aminocaproic, puternici inhibitori ai proteazelor, aduce dovezi în plus asupra mecanismului formării extrarenale a hormonului în condiții de hipoxie. Formarea eritropoetinei nu trebuie considerată ca un rezultat exclusiv al unor reacții proteolitice, deoarece plasma exercită și activități esterazice la fel ca și factorul eritropoetic renal. Expunerea repetată la hipoxie a șobolanilor tratați cu Trasylol confirmă încă o dată existența celor două mecanisme de adaptare la hipoxie, mecanismul neuro-reflex sinocarotidian și mecanismul neuro-

umoral cu secreția de eritropoetină. Rezultatele sînt expuse în fig. 29.

Trasylolul inhibă formarea eritropoetinei la șobolani supuși hipoxiei hipobare zilnic (0,4 atm.) cîte 5 ore, repetată timp de trei zile consecutiv, nu însă și creșterea imediată, cu caracter tranzitor, a eritrocitelor circulante, efect al unui proces de citodiabază, declanșată reflex (fig. 30).

Incubarea serului de șobolan, ce a primit acid epsilon-aminocaproic și a fost menținut 5 ore la 0,4 atm, cu hialuronidază sau acetilcolinesterază, nu modifică în mod semnificativ capacitatea eri-

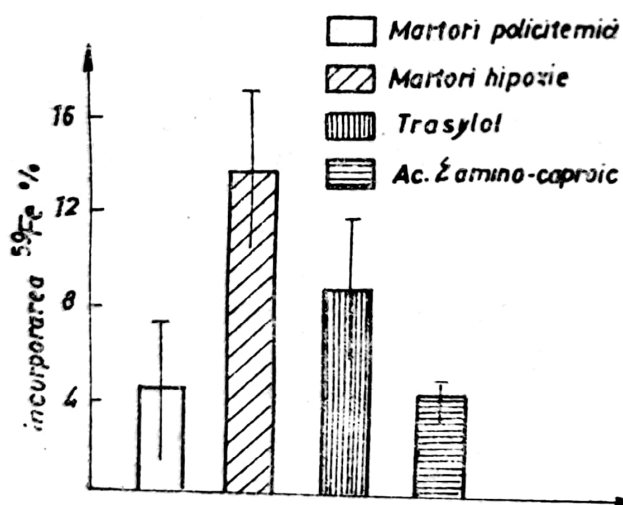


Fig. 29. Incorporarea ^{59}Fe în eritrocitele circulante, la șoareci policitemici posthipoxici, injectați cu pseudoglobulinele F II provenite de la șobolanii care au fost tratați înainte de expunere la hipoxie (5 ore la 0,4 atm.) cu Trasylol 25.000 U/kg corp sau EACA 1 g/kg corp. Comparativ sînt date rezultatele unui lot martor de șoareci, tratați cu pseudoglobulinele F II, extrase din serul șobolanilor de control menținuți în aceleași condiții de hipoxie.

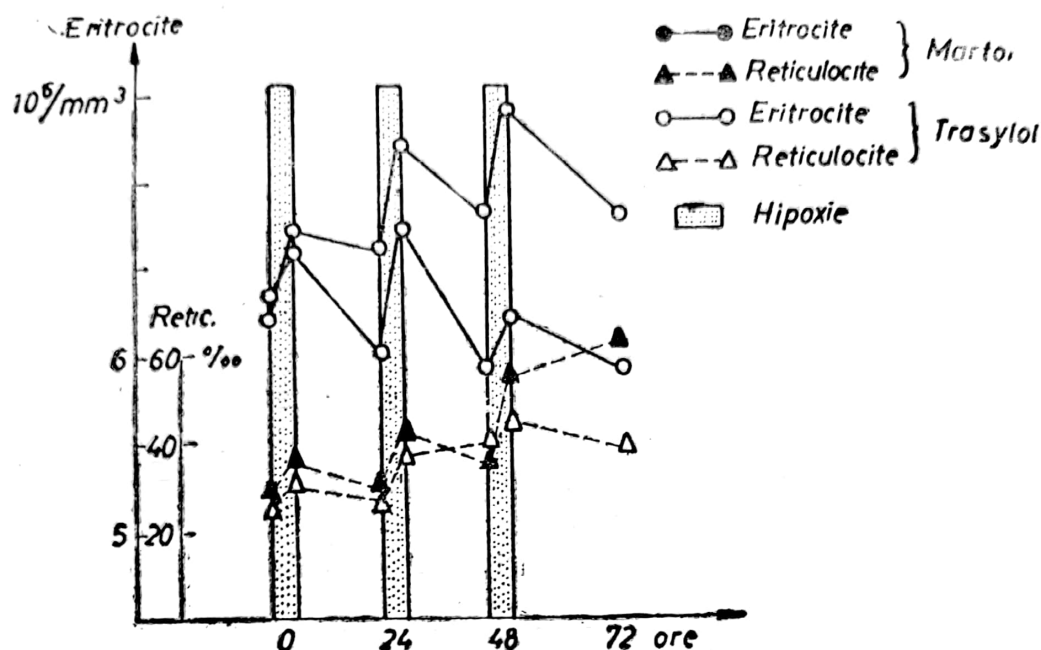


Fig. 30. Modificările reticulocitelor și eritrocitelor sub influența hipoxiei (5 ore zilnic la 0,4 atm. timp de 3 zile) la șobolani injectați zilnic, înainte de expunerea la hipoxie, cu Trasylol 25.000 U/kg corp. Comparativ sînt date rezultatele unui lot martor de șobolani, menținuți în aceleași condiții de hipoxie, dar neinjectați.

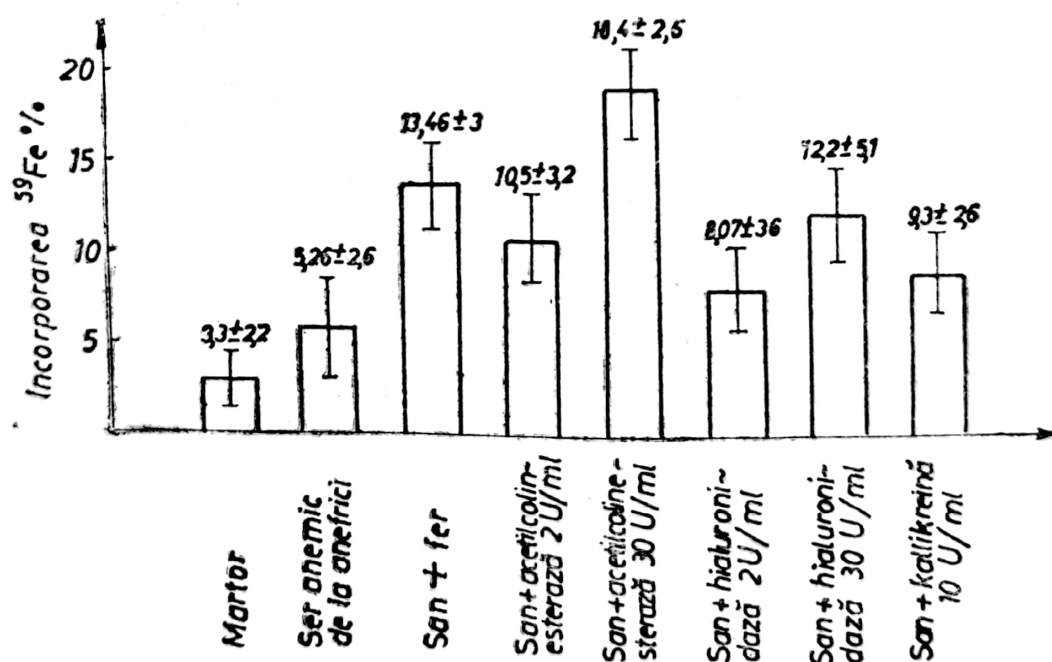


Fig. 31. Incorporarea ^{59}Fe în eritrocitele circulante ale șoarecilor policitemici post-hipoxici, sub influența serului de șobolani anemizați cu fenilhidrazină și nefrectomizați (SAN), a serului de șobolani anemici nefrectomizați (SAN) incubat cu factor eritropoetic renal, acetilcolinesterază sau hialuronidază în doză de 2 U și 30 U/ml și kalikreină 10 U/ml și a soluției izotone de clorură de sodiu (lot de control).

trostimulatoare a serului. Dozele de 120 U hialuronidază/ml sau de 30 U acetilcolinesterază/ml determină o creștere semnificativă a capacității eritrostimulatoare a fracțiunii I. Incubarea fracțiunii a II-a cu aceleași doze de enzime, rămîne fără rezultate. Adăugarea unor doze mai mici de hialuronidază de 30 U/ml fracțiunii I nu modifică proprietățile biologice ale substratului (fig. 31).

Acetilcolinesteraza, hialuronidaza sau kallicreina determină *in vitro* formarea de eritropoetină atunci cînd se întrebuintează ca și substrat serul șobolanilor anemiați și nefrectomizați, deci în lipsa factorului eritropoetic renal. Enzimele enumerate s-ar putea încadra, alături de factorul eritropoetic renal, printre eritrogenine. Formarea eritropoetinei și în lipsa factorului eritropoetic renal a fost demonstrată și de Schooley, Zanjani și Gordon (1970), folosind *in vivo* și *in vitro* un ser imun față de factorul eritropoetic renal.

Administrarea în condiții de hipoxie a blocaților enzimatici în-lătură formarea de eritrogenină, însă nu și a substratului seric, a eritropoetinogenului.

Activarea mai amplă a eritropoezei de către eritropoetina generată *in vitro* din serul de șobolan anemic și nefrectomizat ca sursă de profactor seric, comparativ cu activarea mai redusă din serul animalelor hipoxice tratate cu EACA, s-ar putea explica prin continuarea activității enzimelor și după injectare în organism.

Deci, eritropoetina s-ar forma în urma interacțiunii unei hidrolaze de tip proteazic și esterazic, de proveniență renală și extrarenală cu un substrat proteic seric.

Pornind de la aceste date (Baciu și Ivanof, 1977) s-a urmărit *in vivo* în ce măsură activitatea esterazică se modifică global în ser și, de asemenea, care sînt variațiile activității colinesterazice serice la animalele supuse la hipoxie.

Cercetările s-au efectuat pe șobolani albi Wistar în greutate de 150—250 g, expuși la presiune atmosferică de 0,5 atm. în barocameră. Înainte de expunerea animalelor la hipoxie și la intervale de 4, 12, 24, 48 și 72 ore, din ser s-a măsurat activitatea esterazică, colinesterazică și s-a dozat acidul neuraminic.

Dozarea activității esterazice serice (aliesteraza) s-a efectuat după o variantă a metodei descrise de Seligman (1963). S-a folosit ca substrat naftilauratul, iar ca reactiv de cuplare al beta-naftolului eliberat în reacția enzimatică, acidul diazobenzen-sulfonic.

Activitatea colinesterazei serice a fost apreciată cu micrometoda standardizată de disciplina de biochimie Cluj, prin reacția tio-

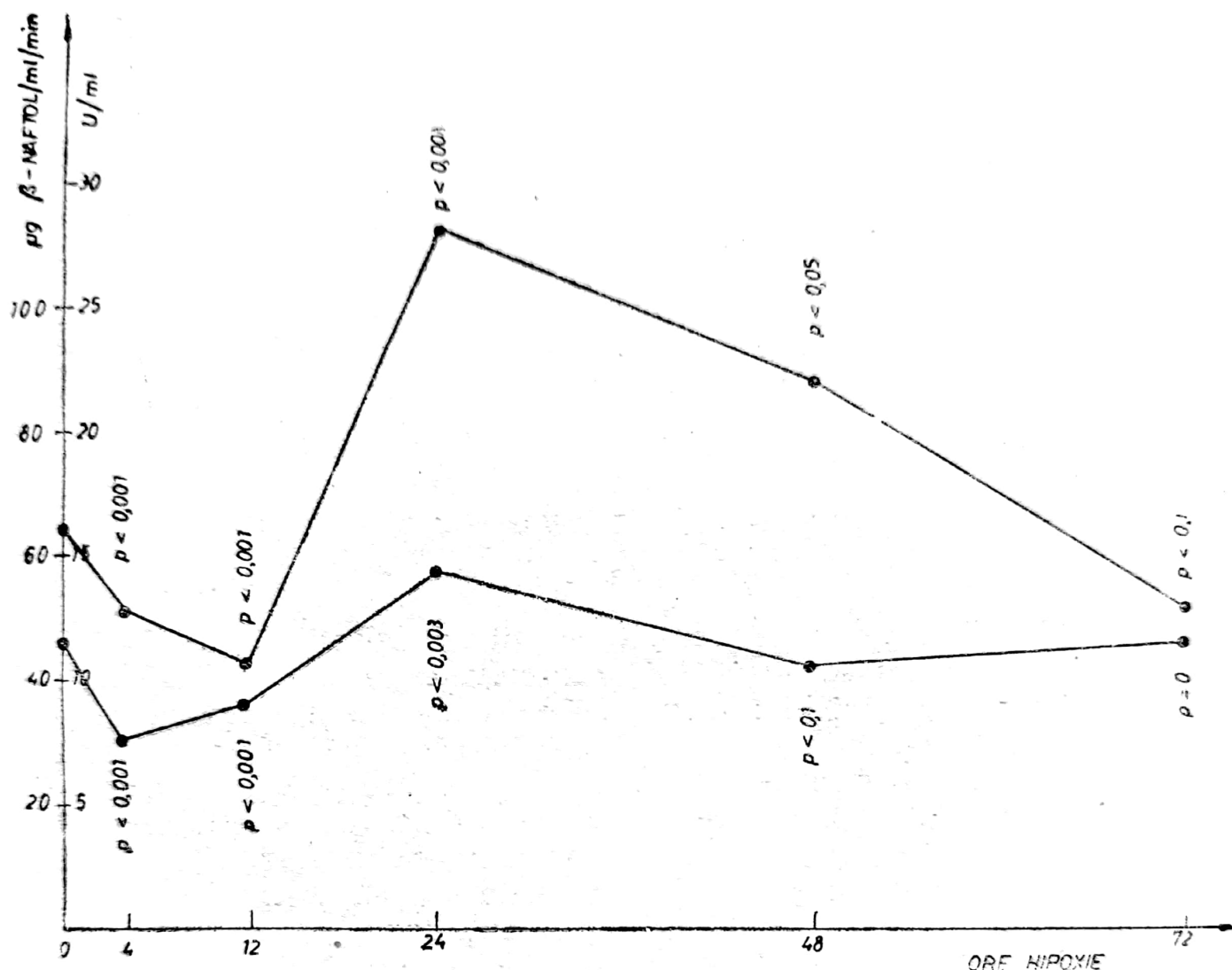


Fig. 32. Activitatea aliesterazică (jos) și colinesterazică (sus) a serului șobolanilor expuși 4, 12, 24, 48 și 72 ore la hipoxie (altitudine simulată de 5500 m).

colinei, eliberate din substratul butiriltiocolină, cu acidul 5,5'-ditio-bis — 2-nitrobenzoic.

Concentrația acidului neuraminic s-a apreciat cu reactivul Bial.

În cursul expunerii șobolanilor la hipoxie simulată de 5500 m în barocameră, se constată (fig. 32): scăderea cu 35,5% a activității esterazelor serice în primele 4—12 ore de hipoxie, urmată de creșterea cu 19% la 24 ore și revenirea la valori normale între 48—72 ore; scăderea în același interval de timp a activității colinesterazei din ser cu 33,5%, urmată de creșterea cu 65% la 24 ore și revenirea la valori inițiale în intervalul de 48—72 ore.

Rezultatele obținute ridică problema influențelor reciproce dintre prezența eritropoetinei în ser și activitatea esterazică a serului. De aceea, pentru verificare, s-a testat efectul *in vitro* al eritropoe-

tinei asupra activității aliesterazei. Rezultatele obținute cu concentrații de eritropoetină purificată și testată în laboratorul nostru, superioare celor din sângele animalelor hipoxice (3 și 6 U/ml ser) nu au evidențiat nici un efect inhibitor al eritropoetinei asupra activității esterazice. Testarea activității esterazice a eritropoetinei cu naftillaurat a dat la fel rezultate negative.

Scăderea activității esterazelor în etapa de creștere maximă a eritropoetinei în ser, urmată de creșterea acestei activități concomitent cu dispariția hormonului, nu exclude posibilitatea existenței unei corelații între mecanismul de formare al eritropoetinei și activitatea hidrolitică a serului.

ORIGINEA SUBCELULARĂ A PROFCTORULUI ERITROPOETIC

Localizarea subcelulară a profactorului eritropoetic constituie una din problemele de cercetare încă nerezolvate pe deplin. Descoperit în extractele de rinichi hipoxic (1968) și considerat drept o enzimă hidrolitică cu loc de acțiune în plasmă (1973, 1968), profactorul eritropoetic a fost găsit fie în proteinele nucleare (1968), fie în fracțiunea mitocondriilor ușoare (1965) sau alternativ în mitocondrii și microzomi (1969). În 1974, Libbin obține creșterea activității eritropoetice în serul șobolanilor după incubarea acestuia cu fracțiuni lizozomale extrase din rinichi hipoxic.

Pentru clarificarea efectelor hipoxiei asupra lizozomilor renali precum și a contribuției acestor formațiuni la inducerea activității eritropoetice, s-a lucrat (Baciu, Ivanof, Mureșan, Pavel, Benga, 1978) pe loturi de șobolani în greutate de 200—250 g, grupate câte 6—8 animale per lot. Patru loturi au fost expuse hipoxiei hipobare de 0,5 atm., pe durate de 1½, 4, 8 și 12 ore. Un lot a servit drept martor, iar un ultim lot a fost tratat timp de 7 zile cu hemisuccinat de cortizol (stabilizant al membranelor lizozomale), administrat în injecții i.p. (5 mg/100 g corp) și apoi supus hipoxiei timp de 4 ore.

Din sinusul orbital s-a recoltat sângele, iar în ser s-a dozat activitatea fosfatazei acide, a N-acetil-beta-glucozaminidazei și activitatea eritropoetică.

Lizozomii renali au fost separați după Shibko și colab. (1965). S-a testat activitatea liberă și totală (activitatea totală după tratarea cu detergent neionic Lubrol V), utilizând fosfataza acidă ca enzimă marker, iar din aceste două valori s-a calculat procentul

de latență care exprimă integritatea membranelor (activitate liberă/activitate totală $\times 100$).

Investigarea proprietăților eritropoetin-inductoare ale lizozomilor s-a făcut prin injectarea i.v. la șoareci policitemici a unui amestec 1 : 1 (v/v) de lizozomi cu ser normal de șobolan, incubat 30 minute la 37°C *in vitro*. Cantitatea injectată per șoarece policitemic a fost de 1,4 mg proteină lizozomală. Testarea eritropoetinei după administrarea de ser sau amestec de lizozomi — ser normal —, s-a efectuat urmărind incorporarea ^{59}Fe în hematiile șoarecilor policitemici.

Controlul impurificării lizozomilor cu mitocondrii s-a efectuat pe baza dozării activității succinatdehidrogenazei.

Proteinele s-au dozat după Lowry și colab. (1951).

Figura 33 redă activitatea enzimelor lizozomale din serul animalelor expuse hipoxiei, pe diferite perioade de timp. Din aceste date rezultă că activitatea N-acetil-beta-glucosaminidazei scade semnificativ în raport cu martorul (12,7 $\mu\text{moli/mg/min}$), la 4 ore, apoi crește ușor la 8 și 12 ore. Activitatea fosfatazei acide, după o scădere slab semnificativă în primele două ore (10,1 față de 11,3

$\mu\text{moli/mg/min}$ la lotul martor), crește semnificativ la 4 ore (12,8 $\mu\text{moli/mg/min}$) și intens la 8 și 12 ore de hipoxie ($p < 0,001$). La lotul tratat cu cortizol și expus 4 ore la hipoxie, activitatea fosfatazică acidă este sub valoarea martorilor (7,4 $\mu\text{moli/mg/min}$).

În lizozomi, activitatea fosfatazei acide libere crește progresiv de la valoarea martorilor, de 6,4 $\mu\text{moli/mg/min}$, revenind treptat spre valoarea normală la 8 ore (6,7 $\mu\text{moli/mg/min}$) și sub această

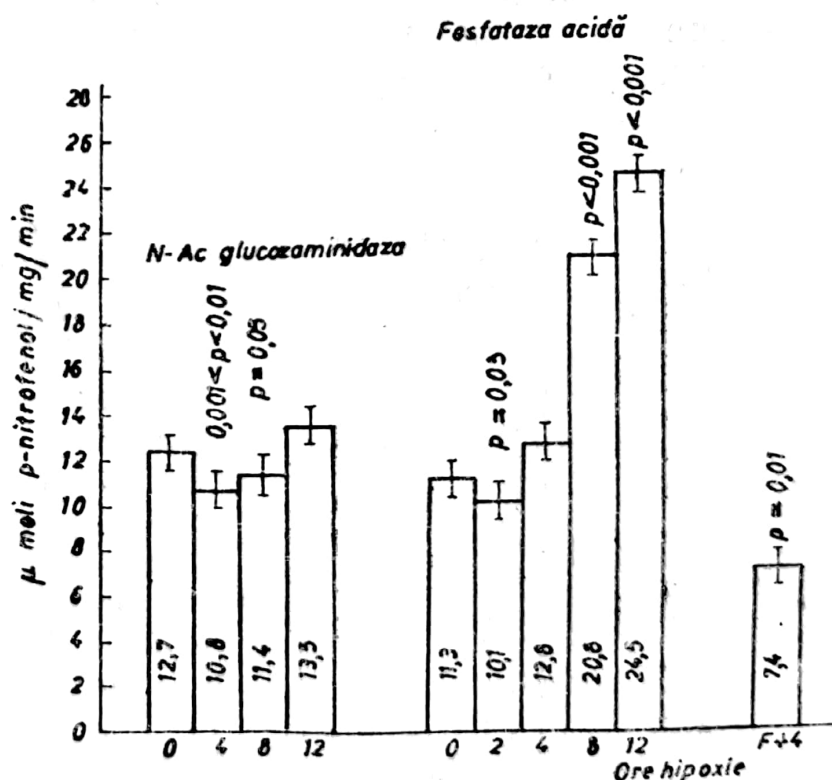


Fig. 33. Eliberarea enzimelor lizozomale în serul șobolanilor expuși la hipoxie. (- Acetil-glucosaminidaza și fosfataza acidă) F+4, reprezintă lotul animalelor tratate cu cortizol și apoi expuse 4 ore la hipoxie.

valoare la 12 ore ($5,5 \mu\text{moli/mg/min}$). Toate aceste variații ale activității sînt statistic nesemnificative. Lotul tartat cu cortizol are activitatea liberă de $3,1 \mu\text{moli/mg/min}$.

Activitatea totală obținută după tratarea lizozomilor cu Lubrol este în medie de $40 \mu\text{moli/mg/min}$; latența calculată (Fig. 34) prezintă modificări semnificative statistic doar la 4 ore de hipoxie, cînd crește de la 16,5 (valoare medie martor) la $21,3\%$ ($p < 0,001$). Lotul tratat cu cortizol, avînd activitatea liberă de 31 iar cea totală de numai $17 \mu\text{moli/mg/min}$, prezintă o latență de $17,3\%$. Impurificarea preparatelor lizozomale cu mitocondrii — după cum a reieșit din dozarea activității succinatdehidrogenazei — este în medie de $12,7\%$.

Testarea activității eritropoetice a serului și a amestecului de lizozomi și ser normal, este prezentată în fig. 34, în care s-a redat în procente variația incorporării ^{59}Fe în hematiile șoarecilor policitemici injectați cu aceste produse. Atît serul injectat cît și amestecul de lizozomi-ser normal, determină creșteri semnificative statistic ale absorbției de ^{59}Fe , începînd de la $1\frac{1}{2}$ oră de hipoxie. Maximumul se atinge, în ambele cazuri, după 8 ore de hipoxie. Incorporarea scade pronunțat la 12 ore. Lotul tratat cu cortizol prezintă aspecte diferite pentru ser și lizozomi și anume, în vreme ce lizozomii animalelor, tratate, deși expuse 4 ore la hipoxie, nu induc nici

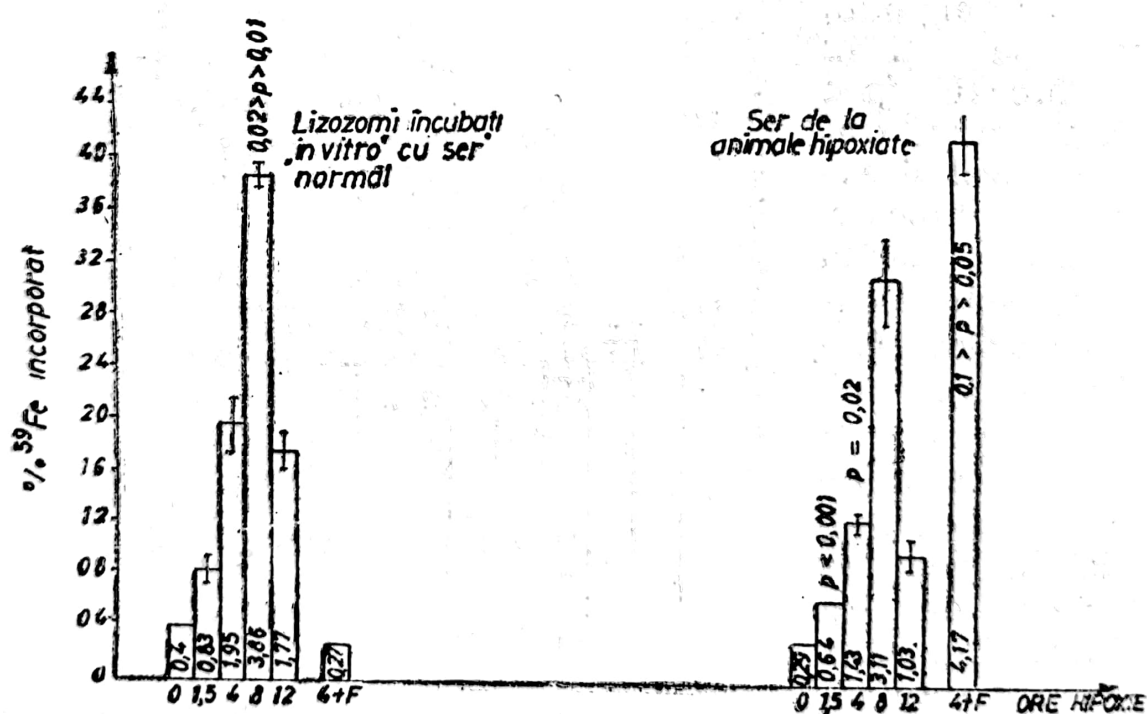


Fig. 34. Efectul lizozomilor renali de șobolani hipoxiați între 90 min și 12 ore, asupra incorporării ^{59}Fe , după incubarea lor *in vitro* cu ser normal (30 min la 37°C), comparativ cu efectul serului animalelor hipoxiate în aceleași condiții.

o activitate eritropoetică (absorbția ^{59}Fe este de 0,23% față de 0,42% la martor), serul acestor animale provoacă o creștere intensă a absorbției de fier (4,18%).

Din datele prezentate rezultă că hipoxia de 0,5 atm, chiar și pe o durată de 12 ore, constituie un stimul relativ blând pentru lizozomii renali, cu efecte reversibile în timp asupra latenței lizozomilor. De aceea, presupunem că valorile crescute ale activității enzimelor lizozomale serice se datorează mai degrabă altor surse. Această presupunere este întărită și de observațiile lui Mahadevan și colab. (1967) cu privire la eliberarea mai ușoară a fosfatazei acide din lizozomii hepatici, comparativ cu eliberarea ei din lizozomii renali.

Faptul că injectarea la șoarecii policitemici a amestecului de lizozomi preincubați *in vitro* cu ser normal determină creșterea absorbției de ^{59}Fe în hematii, demonstrează că lizozomii renali izolați de la animalele hipoxice conțin cu siguranță un factor eritropoetino-formator.

Deoarece lizozomii, a căror membrană a fost stabilizată cu cortizol, nu mai au capacitatea de a induce activitate eritropoetică, se pare că permeabilitatea membranelor joacă un rol important în eliberarea profactorului eritropoetic. Aceste date sînt în concordanță cu observațiile lui Glader și colab., Thirsch și colab., (cit. de Krantz S. B., 1970) și ale lui Naets și colab. (1966) care presupun că hormonii steroizi, și în special cortizonul în concentrații mari, inhibă sinteza endogenă a eritropoetinei, acționînd stimulatîv în eritropoeză printr-un mecanism diferit de al eritropoetinei. Creșterea incorporării ^{59}Fe dată de serul cu cortizol, contrar efectului lizozomilor acestor animale, constituie încă o dovadă în acest sens. De asemenea, în experiențele noastre anterioare, privind efectele stabilizării și labilizării membranelor lizozomale asupra titrului eritropoetinei plasmatice (1978), s-a constatat că vitamina A — agent labilizant — acționează aditiv cu hipoxia, mărind activitatea eritropoetică a serului.

Din cele prezentate rezultă că hipoxia hipobară, nu se poate reduce doar la o acțiune asupra membranelor. Ea reprezintă un efect primar (fapt confirmat și de alți autori), din care derivă apoi efecte mai complexe de activare a reacțiilor intralizozomale (activare autocatalitică a enzimelor lizozomale) și care, în final, pot duce la formarea unuia sau mai multor produși cu proprietăți eritropoetino-formatoare.

Știut fiind faptul că acidul neuraminic este un constituent important al eritropoetinei, Baciuc, Ivanof (1975) au testat concentrația lui în serul șobolanilor expuși la hipoxia hipobară (altitu-

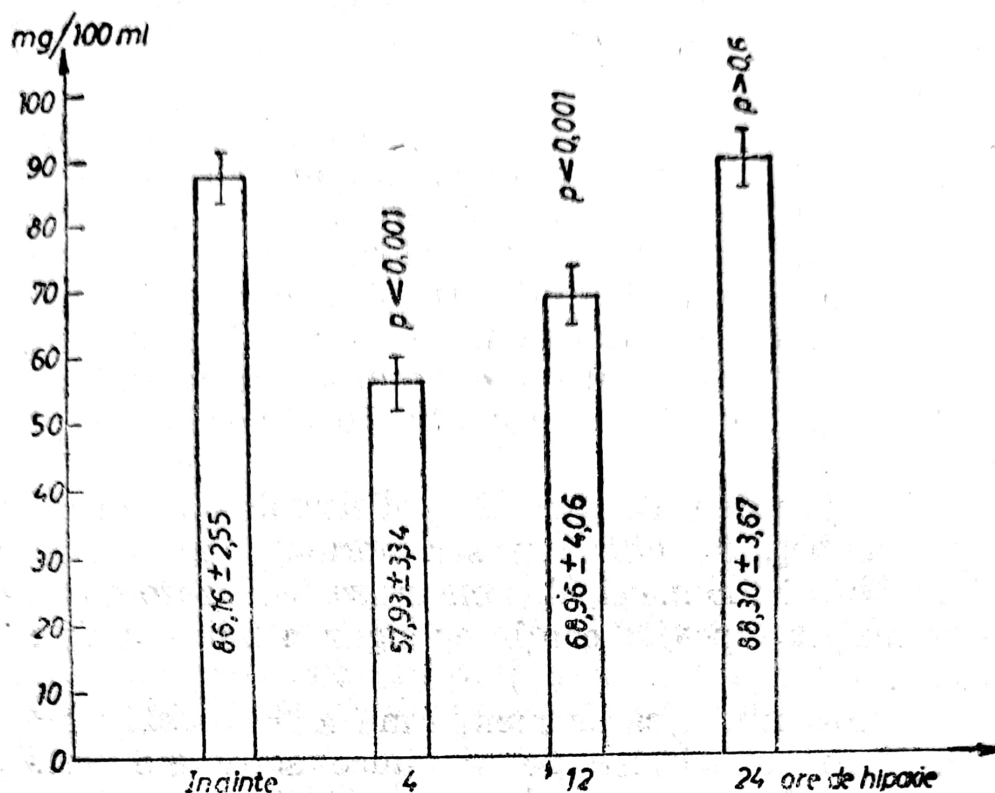


Fig. 35. Concentrația acidului neuraminic în serul șobolanilor expuși 4,12 și 24 ore la hipoxie (altitudine simulată de 5500 m).

dine simulată în barocameră de 5500 m) spectrofotometric cu reactivul Bial.

Concentrația acidului neuraminic din ser scade semnificativ la 4 și 12 ore (32,8% respectiv 20%, $p < 0.001$), iar la 24 ore revine la valori apropiate de cele inițiale (fig. 35).

Scăderea concentrației acidului neuraminic în cursul hipoxiei poate fi pusă în seama consumării sale în cursul sintezei de eritropoetină și a metabolizării lui, ca și constituent al acestui hormon, în măduva osoasă și în ficat.

CAP. XIII.

EFECTE BIOLOGICE ALE ERITROPOETINEI

Cercetările lui Jacobson și colab. (1957), Erslev, (1959), Lajtha și colab. (1962), asupra măduvei osoase, aduc dovezi pentru acțiunea eritropoetinei asupra celulei sușe, pe care o transformă în proeritroblast. În experiențe *in vitro*, pe cultură de măduvă osoasă cu adăugare de eritropoetină și ^{59}Fe Krantz și Goldwasser (1965) ajung la concluzia că hormonul acționează asupra celulei primitive (celula sușe), pentru a induce transformarea sa înspre seria eritrocitară prin stimularea sintezei de ARN, care consecutiv contribuie la sinteza de hemoglobină. Bruce și McCulloch (1964) au descris la șoricei două tipuri de celule sușe: multipotențiale și angajate. Expunerea prelungită a șoarecilor la hipoxie nu alterează numărul celulelor formatoare de colonii din măduva osoasă, ceea ce a făcut pe autori să conchidă că celula sensibilă la eritropoetină nu este celula sușă multipotențială, ci o celulă mai diferențiată, constituind precursorul eritrocitar, care se găsește cu deosebire în splina șoriceilor. Stohlmann și colab. (1968) în cercetări cu vincristină, o substanță statocinetică, ce afectează profund seria eritroidă și mieloidă și numai în mică măsură pe cea megacariocitară, confirmă și dezvoltă această concepție, arătând că eritropoetina, care ar acționa ca depresor, inducând sinteza de ARN, ce intervine direct în producerea de hemoglobină, acționează asupra tuturor elementelor eritrocitare, capabile de a sintetiza ARN (proeritroblast, eritroblast bazofil și policromatofil), diferența între precursorul eritroid și precursorul imediat al acestuia constând în sinteza hemoglobinei. Aceasta ar constitui un motiv ca eritropoetina, care stimulează această sinteză, să nu acționeze asupra celulei sușe nediferențiate.

La fel, Fried și colab. (1968), experimentând pe șoricei, constată că expunerea lor prelungită la hipoxie nu reduce numărul celulelor formatoare de colonii splenice în măduva osoasă femurală. După trei zile de hipoxie hipoxică de $1/2$ atmosferă, celulele sușe

medulare devin mai sensibile la iradiere, ceea ce s-ar explica prin acțiunea de stimulare a eritropoetinei endogene asupra lor; stimularea mai intensă le mărește proporțional radiosensibilitatea. Rezultă deci că eritropoetina stimulează direct proliferarea celulelor sușe, fără a exclude și posibilitatea unei acțiuni asupra celulelor mai diferențiate.

EFECTUL RADIOPROTECTOR AL ERITROPOETINEI

În cercetări experimentale, B a c i u, R o s e n f e l d, R u s u și C u p ă r e s c u (1961) au studiat acțiunea protectoare a eritropoetinei față de iradierea cu Rx. Administrarea a trei doze unice de pseudoglobuline ale fracțiunii a II-a, obținute prin precipitare cu metanol (1959, 1953), care conțin eritropoetina, și iradierea animalelor tratate, la 24 de ore după ultima injecție, produce un efect protector semnificativ din punct de vedere statistic.

Astfel, șoarecii injectați cu 1,2 U eritropoetină și iradiați letal cu o doză unică de 550 r, înainte cu 24 ore, supraviețuiesc pînă în ziua a 30-a de la iradiere, în proporție de 100%, pe cînd cei neinjectați, supraviețuiesc numai într-un procent de 30%; pînă în ziua a 60-a de la iradiere, animalele injectate și iradiate continuă să trăiască într-o proporție de 80%, în schimb cele neinjectate sucombă pînă la ultimul.

Șoarecii din lotul iradiat cu o doză unică de 650 r și injectați în prealabil cu eritropoetină, supraviețuiesc pînă în ziua a 30-a de la iradiere în proporție de 70%, în schimb martorii sucombă în totalitatea lor, la aceeași doză de raze X; la 60 de zile după iradiere, animalele injectate în prealabil cu eritropoetină supraviețuiesc într-un procent de 60% (fig. 36).

Efectul protector descris s-ar putea explica prin acțiunea nespecifică a proteinelor administrate. Dar, așa cum se știe, prin acest mecanism se obține un efect protector numai la doze semiletale (B a c q, 1954). Pe lîngă aceasta, proteina administrată de noi nu produce leucocitoză, unul din indicii reacției imune nespecifice.

La fel, preparatul nu acționează, datorită unor eventuale impurități de properdină. Se știe din lucrările lui P i l l e m e r și colab., confirmate de B a g d a s a r o v și alții (1958), că properdina scade, după iradierea cîinilor cu doza de 600 r, pînă la valori zero, în unele cazuri, și că administrarea de properdină la șobolani și șoareci, la diferite intervale de timp după iradiere, diminuează letalitatea

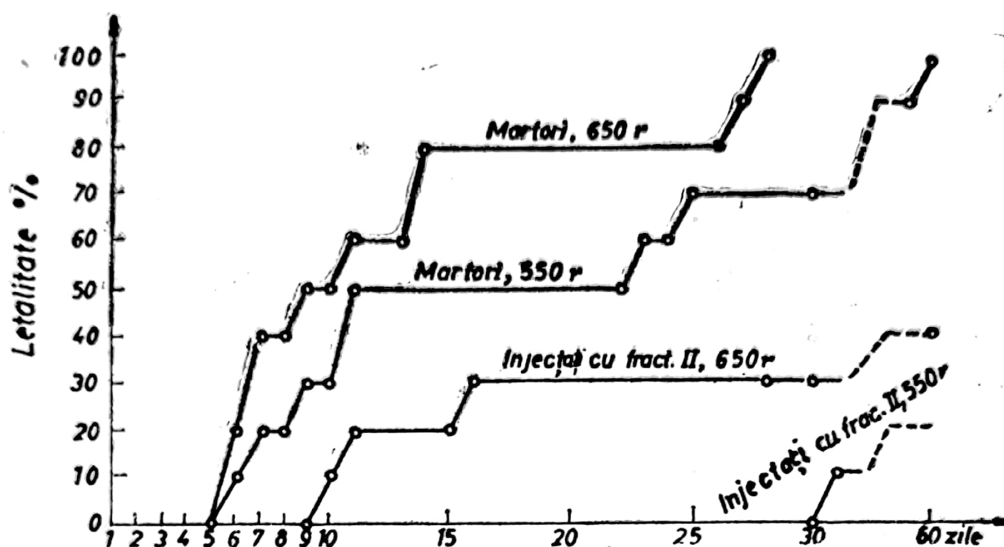


Fig. 36. Acțiunea eritropoetinei asupra letalității la șoarecii iradiați cu o doză unică de 550 și 650 r la 24 ore după administrarea a trei doze zilnice de eritropoetină.

acestora provocată prin bacteriemie, așa cum au arătat Ross și colab. (cit. de Bagdasarov, 1958).

Or, eritropoetina utilizată, pe lângă faptul că este lipsită de euglobuline (properdina fiind o euglobulină), nu manifestă acțiune terapeutică după iradiere.

Ar mai intra în discuție posibilitatea acțiunii eritropoetinei prin grupările —SH și S—S. Acestea, așa cum au arătat Bacq și colab. (cit. Bagdasarov, 1958), intră în competiție cu moleculele sau structurile celulare radiosensibile pentru radicalii liberi (OH și HO_2), care se formează prin radioliza moleculelor de apă în cursul iradierii, sau cu moleculele excitate (Gorizontov, 1959). Ipoteza unui asemenea mecanism de acțiune a eritropoetinei se pare puțin probabilă, doza de proteină purtătoare de grupe sulfhidrice administrată fiind foarte mică (sub 1 mg). Este știut apoi că cisteamina și substanțele înrudite au efect protector, cu atât mai exprimat, cu cât administrarea precede cu mai puțin timp iradierea. În acest caz, intervalul de timp între administrare și iradiere e foarte lung (24 ore).

Mai plauzibilă pare explicația legată de efectul specific al eritropoetinei asupra măduvei hematopoetice. Astfel, Erslev (1959) a demonstrat, prin experiențe simple dar ingenioase, că stimulul anoxic acționează asupra măduvei osoase prin accelerarea diferențierii celulelor sușe în pronormoblaști.

Iradiind animale în perioada imediat următoare acestei reacții proliferative a celulelor medulare primordiale, e posibil că se acționează într-o fază de repaus mitotic, în care radiosensibilitatea

lor este scăzută, în dependență de fazele mitozei (Lebedenski și Moskalev, 1959). Celulele primordiale se găsesc răspândite difuz prin extinderea măduvei hematopoetice, care, în reacția eritrocitară, se substituie măduvei galbene, ceea ce la fel ar putea contribui la potențarea radiorezistenței lor.

Mărirea rezistenței la radiații a celulelor reticulare primordiale este plauzibilă și pentru faptul că, la sfârșitul primei săptămâni după iradiere, mortalitatea prin infecții a animalelor injectate preventiv cu eritropoetină este redusă. Se pare că celulele reticulare rămase integre asigură o reacție leucocitară eficace.

EFECTUL ERITROPOETINEI ASUPRA CELULELOR MEDULARE

În cercetări experimentale pe șoareci, odată cu studierea dinamicii medulare, s-a urmărit și radiosensibilitatea măduvei, modificată sub acțiunea stimuloare a eritropoetinei (Baciu, Telia, Dorofteiu, 1962). Ca sursă de eritropoetină s-a utilizat, ca și în lucrările anterioare, fracțiunea a II-a pseudoglobulinică a serului de iepure anemiat cu fenilhidrazină, obținută prin separarea proteinelor serice cu metanol la rece după Dubert și colab. (1953) și precipitarea euglobulinelor acestei fracțiuni la pH 5,2 cu acid acetic 10%.

S-au urmărit anume modificările elementelor figurate roșii, ale reticulocitelor și hemoglobinei, înainte și după administrarea, la diferite intervale și doze a eritropoetinei în cantitate de 0,7% din greutatea animalului, pe doză, exprimată în volumul din care s-a extras.

Determinările s-au făcut pe grupe de animale la un interval de 24 de ore, după o singură doză de eritropoetină; la grupa a II-a 24 de ore, după două doze administrate zilnic; la grupa a III-a după 24 ore de la trei doze administrate zilnic; iar la grupele IV și V, la intervale de respectiv 72 de ore, după trei doze administrate zilnic.

După efectuarea determinărilor, animalele au fost sacrificate și li s-a determinat numărul absolut de elemente nucleate din seria roșie dintr-o porțiune de măduvă osoasă, obținută din 8 mm diafiză femurală. Numărul total de elemente nucleate din măduvă a fost determinat după tehnica Urso și Congdon (1957), iar numărul de elemente medulare ale seriei roșii, prin efectuarea unor frotiuri de măduvă după tehnica Yoffey și colab. (1954).

Pentru studierea efectului radioprotector al eritropoetinei în funcție de doză și interval de timp de la administrare, un lot de 100 de șoareci, împărțit în 9 grupe, a fost iradiat total cu o doză unică de 600 r, câmp deschis, distanță focală de 40 cm, 160 Kv, 10 mA, 0,5 mm, cu filtru, în cușcă rotativă. S-a urmărit mortalitatea animalelor la intervale de 10, 30 și 60 de zile după iradiere. Grupa I de animale a fost iradiată la o zi, după o singură doză de eritropoetină; grupa a II-a la o zi, după două doze, administrate la un interval de 24 ore; grupa a III-a și a IV-a la 1 și 2 zile, după trei doze, administrate în aceleași condiții.

Modificările elementelor totale medulare nucleate, ale elementelor medulare din seria roșie ale reticulocitelor și hematiilor, după administrarea a 1—3 doze de eritropoetină, sînt reprezentate în fig. 37.

Se observă o creștere maximă a hematiilor în ziua a 4-a și a 5-a, a reticulocitelor în ziua a 2-a și a 3-a, paralelă cu scăderea

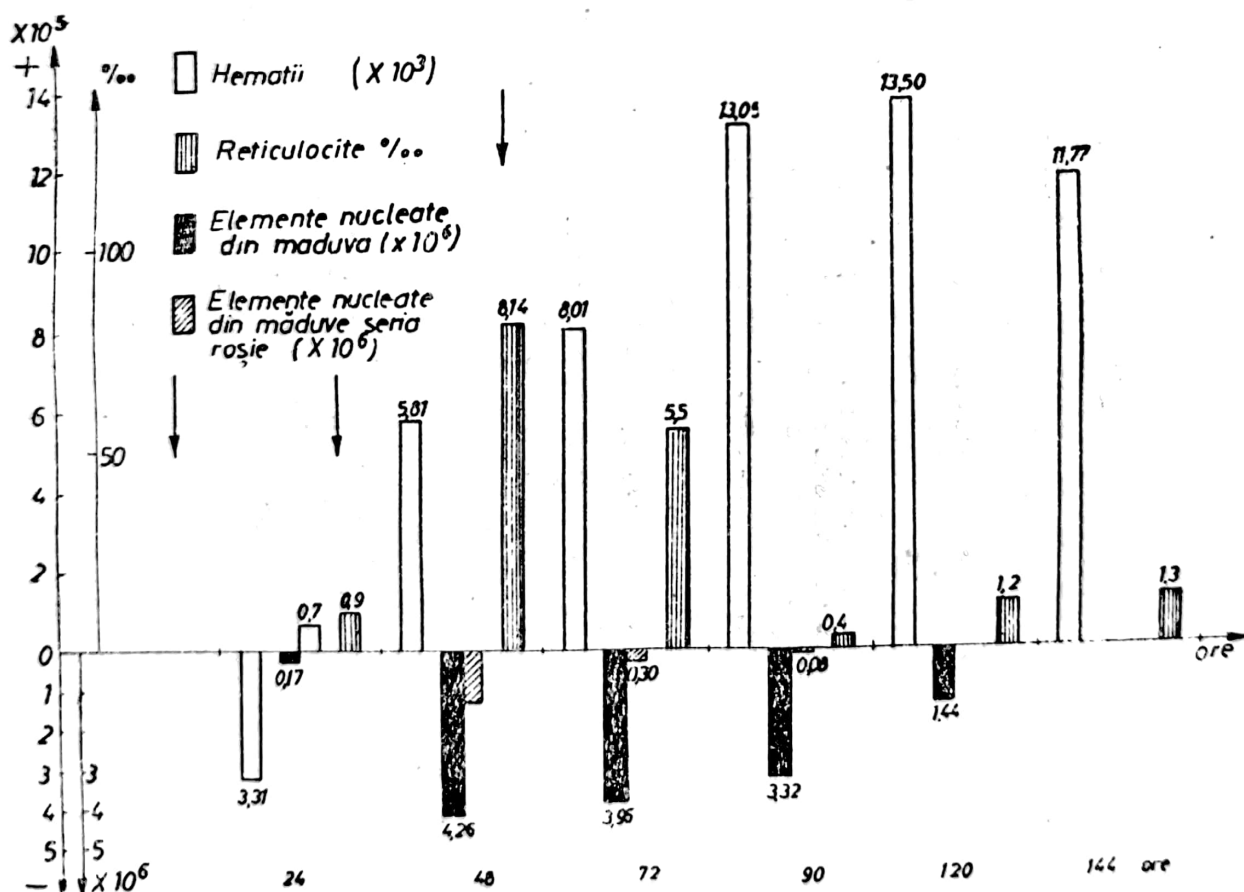


Fig. 37. Modificările elementelor nucleate medulare totale ale elementelor medulare din seria roșie și ale reticulocitelor și hematiilor din sângele periferic după administrarea a 1—3 doze de eritropoetină.

elementelor nucleate, precum și a celulelor roșii din măduvă, în zilele a 2-a, a 3-a și a 4-a.

În fig. 38 este reprezentată variația elementelor seriei roșii medulare la animalele tratate cu 1—3 doze de eritropoetină. Paralel, pe același grafic, în coloane, este trecută mortalitatea la 10, 30 și 60 de zile după iradierea totală unică cu 600 r. Coloanele corespund zilei în care s-a făcut iradierea.

Mortalitatea animalelor de experiență variază în raport cu numărul dozelor și cu intervalul de la administrarea eritropoetinei. Mortalitatea este mai mică dacă iradierea se face la animale a căror măduvă conține un număr mic de elemente tinere (hemocitoblaști), adică 24 de ore după administrarea unei doze și la 24 de ore după administrarea a trei doze. Mortalitatea la loturile II și IV, la care numărul hemocitoblaștilor și proeritroblaștilor este crescut față de martori, la 10 și 30 de zile, depășește pe cea a martorilor. Pe acest grafic se mai constată că mortalitatea în primele 10 zile este nulă, la lotul iradiat la 24 de ore, după o singură doză

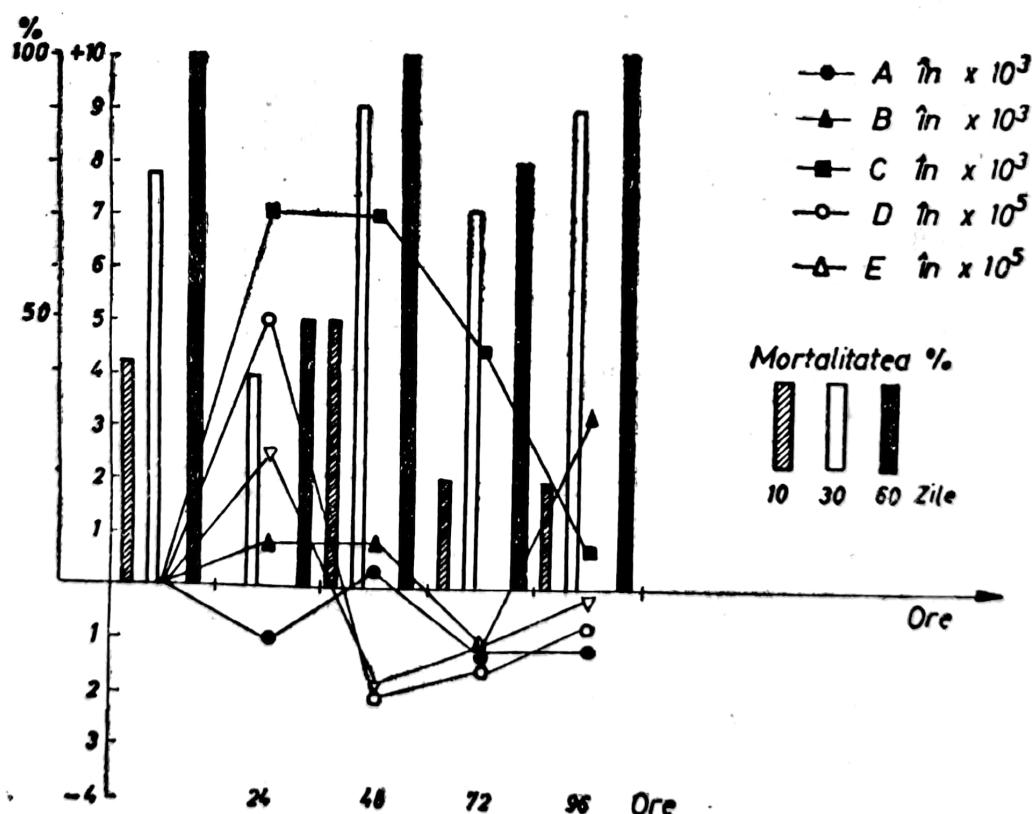


Fig. 38. Variația elementelor seriei roșii la animalele tratate cu 1—3 doze de eritropoetină și mortalitatea la 10, 30 și 60 de zile după o iradiere totală unică cu 600 r la șoarecii tratați similar.

de eritropoetină, față de lotul iradiat, la 24 de ore, după trei doze de eritropoetină, la care mortalitatea, în acest interval, este de 20%.

Datele expuse confirmă rezultatele asupra acțiunii radioprotectoare a eritropoetinei, administrată șoarecelui alb în 1—3 doze, dacă iradierea se face la 24 ore după ultima injecție (1971). Ele completează constatările anterioare în sensul că radioprotecția maximă după eritropoetină se produce la 24 de ore de la administrarea acesteia într-o doză unică.

În ce privește dinamica răspunsului seriei roșii circulante la eritropoetină, se constată că o doză zilnică de 1 U eritropoetină, obținută după procedeul pe care l-am descris (1959, 1961), administrată trei zile consecutiv, produce la șoarece creșterea reticulocitelor la valori maxime în ziua a 2-a a 3-a (+55—+80%) și creșterea maximă a hematiilor în ziua a 4-a și a 5-a de la administrare (+1,3 milioane).

Modificările medulare caracteristice ale reacției eritrocitare preced modificările sanguine expuse. Prin urmare, ele se vor găsi în ziua 1-a și a 2-a de la administrarea eritropoetinei. De fapt, din analiza rezultatelor reiese că numărul maxim de celule roșii din măduvă se găsește la 24 ore, după o doză unică de eritropoetină, când reticulocitoza în sângele periferic este inaparentă (+9,9‰), valorile hematiilor circulante fiind, în medie cu 300,000/mm³ inferioare celor dinainte de administrarea eritropoetinei. Creșterea elementelor roșii totale medulare reprezintă 30% față de valorile lotului martor și se face pe socoteala eritroblaștilor policromatofili și oxifili, care cresc aproximativ cu 50%. Hemocitoblaștii prezintă concomitent modificări în sens invers. Astfel, ei scad aproape cu 30%. Seriile intermediare între hemocitoblast și eritroblastul policromatofil, adică proeritroblaști și eritroblaștii bazofili, nu suferă modificări asupra cărora se ne oprim.

Deci, în următoarele 24 de ore după administrarea eritropoetinei, se produce o exprimată sărăcire a măduvei în hemocitoblaști. Următoarele două serii sînt puțin modificate (proeritroblast, eritroblast bazofil), pentru ca elementele mai diferențiate să crească numeric, la valori aproximativ duble.

Sărăcirea măduvei osoase în celule sușe, hemocitoblaști, care ar coincide cu un repaus mitotic, explică radiosensibilitatea sa redusă în această perioadă. Ea se mai poate explica și prin prezența, în măduvă, de elemente roșii diferențiate, care nu se mai divid. Din aceste două mecanisme, din punctul de vedere al radioprotecției, apare mai important primul mecanism, întrucît acesta asigură integritatea seriei albe. De fapt, letalitatea în primele zece zile, datorată infecțiilor, este nulă.

Datele asupra elementelor medulare mai demonstrează sărăcirea măduvei osoase în hemocitoblaști la aproape două treimi, ceea ce pledează pentru acțiunea eritropoetinei asupra hemocitoblaștilor, dacă nu direct, posibil prin retroacțiune. În ziua următoare, lansarea reticulocitelor este în „plină perioadă” și începe lansarea hematiilor din măduvă. Elementele roșii diferențiate medulare scad la valori minime, simultan cu creșterea elementelor nediferențiate (hemocitoblast și proeritroblast), peste valorile găsite la animalele de control. Letalitatea foarte exprimată, care depășește pe cea a animalelor de control, în cazul iradierii în această zi, poate fi intim corelată cu creșterea elementelor tinere a hemocitoblaștilor și proeritroblaștilor. Letalitatea ridicată, la 48 de ore după administrarea a trei doze zilnice de eritropoetină, coincide cu cea mai exprimată creștere a hemocitoblaștilor.

Aceste rezultate arată un paralelism între celularitatea măduvei și sensibilitatea la radiații, așa cum lucrurile sînt bine stabilite în radiobiologie.

Datele expuse sînt în acord cu cercetările lui Sepselevici (1959), care arată că o singură hemoragie, provocată preliminar la cîini, protejează funcția eritropoetică normală a măduvei osoase față de iradierea totală letală.

Practic aceste rezultate demonstrează posibilitatea de a reduce mortalitatea la o iradiere unică letală efectuată la 24 de ore după injectarea de eritropoetină (0% față de 40% în primele 10 zile; 50% față de 100% la 60 de zile).

În aplicarea radioterapiei se pare că tratamentul cu eritropoetină ar putea constitui un adjuvant important, care să asigure protejarea măduvei hematogene, în condiții care urmează să fie stabilite la om, față de efectul nociv al razelor X asupra celulelor medulare.

În alte cercetări pe animale, cu eritropoeza stimulată cu fenilhidrazină, prin hemoragie (Smith și Hodgson, 1968), prin menținerea la hipoxie (Tribukait, 1966) sau prin administrare de eritropoetină exogenă (Hodgson, 1962; Mauss, 1969) s-a arătat, la fel, creșterea radiorezistenței animalelor iradiate cu doze semiletale sau letale 100%.

În lucrările lui Smith, rezistența mărită la radiații, evidențiată printr-o supraviețuire de 80—90%, apare cînd iradierea se face a 7-a zi după injectarea cu fenilhidrazină în doză unică (1970); Tribukait (1966) obține efectul maxim (85%) între 18—72 ore după întreruperea hipoxiei de 4—10 zile, a animalelor menținute la altitudine simulată de 6000 m.

EFFECTUL ERITROPOETINEI ASUPRA ACIZILOR NUCLEICI MEDULARI

În alte studii privind efectul eritropoetinei asupra eritronului medular (Baciu, Pavel, Prodan, Deac 1974), s-a urmărit, cu eritropoetină exogenă 6 U/șobolan, la intervale diferite de timp de la administrarea eritropoetinei (4, 6, 8, 12 și 16 ore) din măduva diafizară a femurului de șobolan, conținutul de acizi nucleici, indicele mitotic și procentul de metafaze. În acest studiu, autorii au reluat și problema efectelor iradierii cu Rx asupra funcției eritropoetice pe șoareci injectați în prealabil cu 1,2 UE.

Eritropoetina exogenă, administrată la diferite intervale de timp înaintea iradierii, modifică inegal radiosensibilitatea animalelor.

Administrată 6 ore înainte de iradiere, eritropoetina, mărește sensibilitatea animalelor la radiații, procentul de supraviețuiri scăzând sub cel al lotului martor. Cu opt ore înainte de iradiere, eritropoetina are deja un ușor efect radioprotector, care pentru intervalul de 12 ore este maxim (60% supraviețuitori, comparativ cu 27% la martori).

Efectul protector obținut pentru intervalul de 12 ore este asemănător, sub raportul procentului de supraviețuiri, cu cel obținut în 1962 (70% la 24 ore).

Efectul protector al eritropoetinei injectate 12 ore înainte de iradiere este net exprimat în primele 10 zile de la iradiere, când procentul de supraviețuitori este de 90%, față de 62% la martori.

Activitatea proliferativă medulară, urmărită prin determinarea indicelui mitotic, ca și cea metabolică, prin bazele purinice și pirimidinice din măduva șobolanilor tratați cu eritropoetină exogenă,

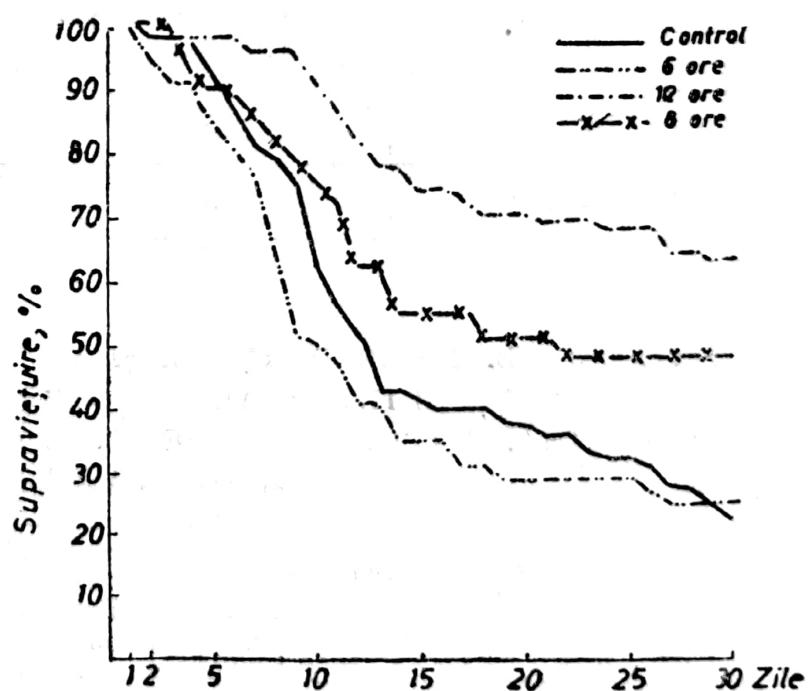


Fig. 39. Procentul de supraviețuire al șoarecilor injectați cu eritropoetină (1,2 U/animal) și iradiați la 6, 8 și 12 ore după administrarea hormonului, comparativ cu lotul martor.

suferă de asemenea modificări importante în funcție de intervalul de timp scurs de la injectarea eritropoetinei.

În tabelul V se poate vedea indicele mitotic, iar ca element de control procentul de metafaze, care se dublează, la patru ore de la injectarea eritropoetinei, atingând valori maxime la 6 ore, după care începe să scadă.

Aceeași activare apare în cazul metabolismului acizilor nucleici (tabelul VI) la 4—6 ore, ca expresie a procesului de repliere a

TABELUL V

INDICELE MITOTIC ȘI PROCENTUL METAFAZELOR LA TOTALITATEA CELULELOR DIN MĂDUVA ȘOBOLANILOR, LA DIFERITE INTERVALE DE TIMP DUPĂ ADMINISTRAREA ERITROPOETINEI

<i>Interval de timp, ore, între administrarea eritropoetinei și sacrificare</i>	<i>Număr de animale</i>	<i>Indice mitotic</i>	<i>% metafaze</i>
4	6	$6,96 \pm 0,8$	$3,14 \pm 0,72$
6	5	$9,0 \pm 1,6$	$5,3 \pm 1,8$
8	5	$7,9 \pm 1,8$	$4,12 \pm 0,25$
12	5	$6,2 \pm 0,9$	$3,55 \pm 0,76$
16	5	$6,2 \pm 0,66$	$3,28 \pm 1,14$
martor	5	$3,26 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,57$

TABELUL VI

CONCENTRAȚIA BAZELOR PURINICE ȘI PIRIMIDINICE DIN MĂDUVĂ OSOASĂ LA DIFERITE INTERVALE DE TIMP DUPĂ ADMINISTRAREA DE ERITROPOETINĂ. EXPRIMAREA SE FACE RAPORTAT LA ADENIN, CONSIDERATĂ 1.

<i>Intervalul de timp dintre administrarea eritropoetinei și sacrificare</i>	<i>Număr de animale</i>	<i>Bazele acizilor nucleici</i>				
		<i>Adenină mg%</i>	<i>Timină mg%</i>	<i>Citozină mg%</i>	<i>Guanină mg%</i>	<i>Uracil mg%</i>
Martor	6	1	1,17	1,06	0,93	0,018
4	6	1	1,75	1,87	1,36	0,038
12	6	1	1,25	1,33	1,01	0,48

ADN, ce produce creșterea cantității de timină în raport cu adenina considerată 1. Se constată creșterea simultană a uracilului, constituent al ARN-ului. Efectele menționate diminuează sub influența dozei unice de eritropoetină, iar la 12 ore, concentrația timinei revine la valori normale. Uracilul rămâne însă în continuare la valori ridicate, posibil în legătură cu continuarea sintezei de hemoglobină, inițiată prin ARN.

Decursul reacției medulare devine mai complex după hemoragie masivă. Stimularea secreției endogene de eritropoetină s-a realizat prin provocarea unei hemoragii de 20% din greutatea corpului animalului (30% din volumul sanguin) cu reinjectarea serului. La diferite intervale de timp după provocarea hemoragiei 1, 2, 4, 6, 8, 12 și 20 ore, animalele au fost sacrificate, recoltându-se sânge și măduvă diafizară femurală sau humerală. Încă în prima oră după hemoragie se constată o creștere a indicelui mitotic și a procentului de metafaze, precum și a conținutului de timină în măduvă. Și în acest caz, activitatea proliferativă și metabolică maximă o găsim tot la intervalul de 4—6 ore de la administrarea eritropoetinei, cu deosebirea că valorile bazelor sînt mai ridicate decît după administrarea

TABELUL VII

INDICELE MITOTIC ȘI PROCENTUL DE METAFAZE RAPORTAT LA TOTALITATEA CELULELOR MEDULARE ÎN MĂDUVA ȘOBOLANILOR LA DIFERITE INTERVALE DE TIMP, DUPĂ HEMORAGIE

<i>Interval de timp dintre momentul hemoragiei și sacrificare, în ore.</i>	<i>Număr de animale</i>	<i>Indice mitotic</i>	<i>Procent de metafaze</i>
1	3	$3,36 \pm 0,36$	$2,4 \pm 0,31$
2	3	$4,7 \pm 1,5$	$3,46 \pm 0,95$
4	3	$5,23 \pm 0,37$	$4,1 \pm 0,69$
6	3	$5,7 \pm 0,99$	$4,55 \pm 1,26$
8	3	$5,63 \pm 0,4$	$3,16 \pm 0,78$
12	4	$3,95 \pm 0,68$	$1,37 \pm 0,4$
20	3	$4,63 \pm 0,43$	$4,3 \pm 1,7$
Martori	6	$3,26 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,57$

TABELUL VII

CONCENTRAȚIA BAZELOR PURINICE ȘI PIRIMIDINICE REPREZENTÂND ACIZII NUCLEICI DIN MĂDUVA ANIMALELOR LA DIFERITE INTERVALE DE TIMP, DUPĂ HEMORAGIE

Interval de timp de la hemoragie și sacrificare în ore	Număr de animale	Bazele acizilor nucleici				
		Adenină mg%	Timină mg%	Citozină mg%	Guanină mg%	Uracil mg%
1	6	1	3,87	2,81	0,7	—
2	5	1	4,32	2,96	0,83	—
4	5	1	4,46	1,5	0,84	0,017
12	4	1	1,68	1,56	0,8	0,038
20	4	1	3,00	3,4	0,8	—
Martor	5	1	1,1	1,06	0,93	0,0179

de eritropoetină exogenă. Activitatea scade la 8 ore, tinzând spre valori normale pentru intervalul de 12 și 20 ore.

Smith (1968, 1970), Hodgson (1962, 1968), Mauss (1969) explicau efectul radioprotector obținut ca fiind consecința numărului mărit de celule sușe hematopoetice, care oferă astfel șansa ca un număr mai mare de asemenea celule să iasă de sub acțiunea nocivă a radiațiilor ionizante, asigurând astfel o regenerare rapidă și eficientă a țesutului hematogen. Hodgson (1968), ca și Băciu și colab. (1961, 1962), susțin că efectul eritropoetinei asupra radiosensibilității animalelor ar depinde de faza din ciclul celular în care se găsesc celulele sușe la iradiere.

Alternarea efectelor sensibilizatoare cu cele radioprotectoare, după administrarea eritropoetinei într-un interval de timp care nu depășește 12 ore, timp care, în general, este considerat ca fiind egal cu timpul de generație al celulelor sușe, sub acțiunea eritropoetinei (Feldman, 12 ore, 1968; Orlich 11 ore, 1968; Matoth 10, 8 ore, 1968), repartitia fazică a radiorezistenței după 24 de ore, nu permit explicarea radiosensibilității animalelor, exclusiv ca o consecință a numărului crescut de celule sușe în momentul iradierii, sub acțiunea eritropoetinei.

Rezultatele privind activarea sintezei de acizi nucleici ca și proliferarea celulelor medulare sub acțiunea eritropoetinei, se core-

lează cu cele de radiosensibilitate. Ca și în experiențele lui Krantz și Goldwasser (1965) *in vitro*, ale lui Peretta (1968, 1970) *in vivo* pe șobolani policitemici, la care s-a urmărit efectul incorporării timidinei tritiate în măduva osoasă, și în cele ale lui Pavlov (1969), care a dozat la iepuri diferite forme de acizi nucleici medulari după hemoragie, am constatat o activare a sintezei acizilor nucleici sub acțiunea eritropoetinei.

Dacă rezultatele majorității autorilor citați mai sus arată activarea în primul rând a ARN-ului și doar, la un interval mai îndelungat de timp, a ADN, Powsner (1962) și Dukes (1968, 1970) *in vitro* constată, ca și Baciș și colab., 1974, o stimulare rapidă a sintezei de ADN (5—8 ore Powsner și 3 ore Dukes). La om, Matoth (1959) și Periss (1971) semnalează, sub acțiunea eritropoetinei, o creștere a indicelui mitotic al eritroblaștilor, creștere semnalată și în cercetările expuse.

Valorile mai mari, găsite la animalele cu stimularea secreției endogene de eritropoetină, sînt probabil consecința acțiunii de mai lungă durată a eritropoetinei, secretată continuu pe toată durata hipoxiei.

Concordanța între activitatea metabolică, cea proliferativă medulară și modificarea radiosensibilității sub acțiunea eritropoetinei la diferitele intervale de timp, este o confirmare a acestor efecte, evidențiate pe căi diferite.

Efectul radioprotector maxim, cînd eritropoetina se administrează la 12 ore înaintea iradierii, se explică prin acțiunea sa într-o fază în care sinteza de acizi dezoxiribonucleici este redusă și în care celulele devin rezistente la acțiunea radiațiilor, ciclu care se reia la 24 ore. Invers, cînd iradierea se practică în plină desfășurare a sintezei de acizi nucleici, celulele, asupra cărora a acționat eritropoetina, injectată înainte cu 6 ore, sînt radiosensibile.

Eritropoetina determină deci modificări moleculare interesînd inițial sinteza de ARN și apoi de ADN și o intensă activitate celulară de diferențiere și proliferare. În funcție de faza ciclului celular, în care se găsesc sub influența eritropoetinei, celulele sușe sînt mai sensibile sau mai rezistente la acțiunea radiațiilor.

EFECTUL ERITROPOETINEI ASUPRA ABSORBȚIEI DE RIBOZĂ

Reacțiile inițiate de eritropoetină în celula sușe și în cele nucleate, fie direct fie indirect (prin intermediul unui mesager de ordinul doi) sînt: stimularea sintezei de ARN (Hrinda și co-

lab. 1959, Gross M. și colab. 1970, Krantz S. B. 1973; Perretta și colab. 1965; Rudolph W. și colab. 1967), urmată de creșterea de proteine enzime, dintre care unele implicate în formarea hemului (ALA-sintetaza).

Din cauza concentrațiilor mici aflate în plasmă și mai ales a necesității unei purificări avansate, tehnicile radioimunologice, dezvoltate recent, nu au încă o aplicabilitate extinsă. Metoda cel mai frecvent întrebuințată azi este aceea a măsurării incorporării ^{59}Fe în hematiile șoarecilor policitemici. Limitele metodei derivă în special din durata mare de timp necesară unei testări (cca 7 zile), ca și din variația sensibilității animalelor la eritropoetină. Testările pe culturi de celule în care se urmărește fie cantitatea de hemoglobină formată, fie creșterea numărului de celule roșii nucleate (Gallien Lartigue O. și colab. 1963, Garcia, J. F. și colab. 1959, Gross M. și colab. 1970, Krantz S. B. 1973; Krantz S. B. și colab. 1963; Nakao Kiku și colab. 1966, Șehter și colab. 1965), aduc avantaje în plus în ceea ce privește sensibilitatea, comparativ cu metoda incorporării fierului, dar sînt de asemenea laborioase, necesitînd o mare acuratețe în efectuare, fiind adesea interferate de prezența, în materialul de testat, a unor substanțe cu efecte sinergice sau antagonice cu eritropoetina.

În prezent, se caută reacții biochimice cît mai sensibile și mai specifice la acțiunea eritropoetinei, care să necesite un timp scurt de efectuare. În această direcție se îndreaptă lucrările lui Harrison 1975, care, plecînd de la observația că activitatea citidindezaminazei, în țesuturile eritropoetice de șoarece, crește marcat în urma stimulării măduvei prin hipoxie (sîngerare, hemoliză, sau injecții cu eritropoetină), Basch R. S. și colab. 1972, Rothman J. C. și colab. (1970), au găsit un paralelism satisfăcător între activitatea enzimei din eritrocitele de șoarece și intensitatea stimulului eritropoetic. Reacția precede sinteza hemoglobinei cu 1—2 zile. Metoda are aplicabilitate redusă deoarece enzima este prezentă numai în eritrocitele de șoarece, lipsind la alte specii de mamifere, inclusiv la om.

O serie de alte reacții enzimatic investigate, sensibile la acțiunea eritropoetinei, cum ar fi dozarea respirației celulare în diferite țesuturi (Lutton J. D. și colab. 1972), acetilarea histonelor (Takaku F. și colab. 1969), dozarea activității ALA-sintetazei în măduvă, ca și incorporarea glucozaminei marcate în stroma celulelor medulare (Dukes și colab., 1970), s-au dovedit a nu fi modificate proporțional cu concentrația eritropoetinei.

Baciu, Ivanof, Mureșan, Pavel, (1977) au studiat efectele eritropoetinei endo și exogene, asupra sintezei de ARN, urmărită prin incorporarea ribozei în celulele medulare. Scopul lucrării a fost de a stabili dacă accelerarea pătrunderii ribozei în celule, determinată de intensificarea sintezei eritropoetin-dependente a ARN-ului, reprezintă un răspuns proporțional cu concentrația de hormon și dacă acest răspuns poate servi la testarea eritropoetinei.

Tehnica de testare a absorbției de riboză a constat în incubarea în mediu Hanks, ce conține $0,5 \mu\text{M}$ riboză/ml, a unei suspensii de celule de măduvă femurală ($30\text{—}40 \times 10^6$ celule) prelevată de la șoareci care au fost injectați intraperitoneal, cu 4—5 ore înainte de sacrificare, cu eritropoetină purificată sau ser hipoxic cu activitate eritropoetică. După 90 minute, la 37°C , în materialul acid-solubil, obținut prin precipitare cu acetat de bariu și etanol, s-a dozat riboza neconsumată cu Cl_3Fe — orcinol (Bial 19). Din diferența față de o probă similară inactivată la $\text{ti}=\text{O}$, s-a aflat cantitatea de pentoză incorporată în celule și care s-a exprimat în $\mu\text{g}/10^6$ celule.

Testarea eritropoetinei paralel cu această metodă, și prin metoda incorporării ^{59}Fe în hematiile șoarecilor policitemici, după administrarea unor seruri recoltate de la șobolani hipoxiați 4, 8, 12, 24 ore, au dat rezultate similare (fig. 40), confirmând presupunerea că stimularea incorporării de riboză în celulele medulare reprezintă o consecință a acțiunii hormonului la nivelul metabolismului acestor celule.

Curbele de concentrație-absorbție de riboză, obținute prin injectarea intraperitoneală a unor concentrații de 0,2; 0,5; și 1 UEp/șoarece, demonstrează liniaritatea reacției pentru acest domeniu de concentrație.

Se poate afirma că eritropoetina, atât endo cât și exogenă, antrenează o creștere proporțională cu concentrația ei a incorporării de riboză în celulele medulare. Efectul stimulativ este maxim la 4—5 ore de la administrarea s.c. sau i.p. a hormonului. Datele prezentate concordă cu cele obținute într-o altă lucrare (Baciu și colab., 1974), în care, urmărindu-se indicele mitotic al eritroblaștilor, procentul de metafaze și concentrația ARN-ului în celulele medulare de șobolan, după administrarea a 6 UEp/animal, s-a înregistrat creșterea progresivă a acestor indicatori pînă la 6 ore. De asemenea și alți autori (Hrinda M. E. și colab., 1969; Pavlov A. D., 1969; Perretta M. P. 1967) au raportat creșterea ARN-ului medular sub influența eritropoetinei, începînd la 10—15 minute de la adăugarea eritropoetinei, fiind maximă la 4 ore. Rezultă că relația dintre riboza incorporată și concentrația eritropoetinei plas-

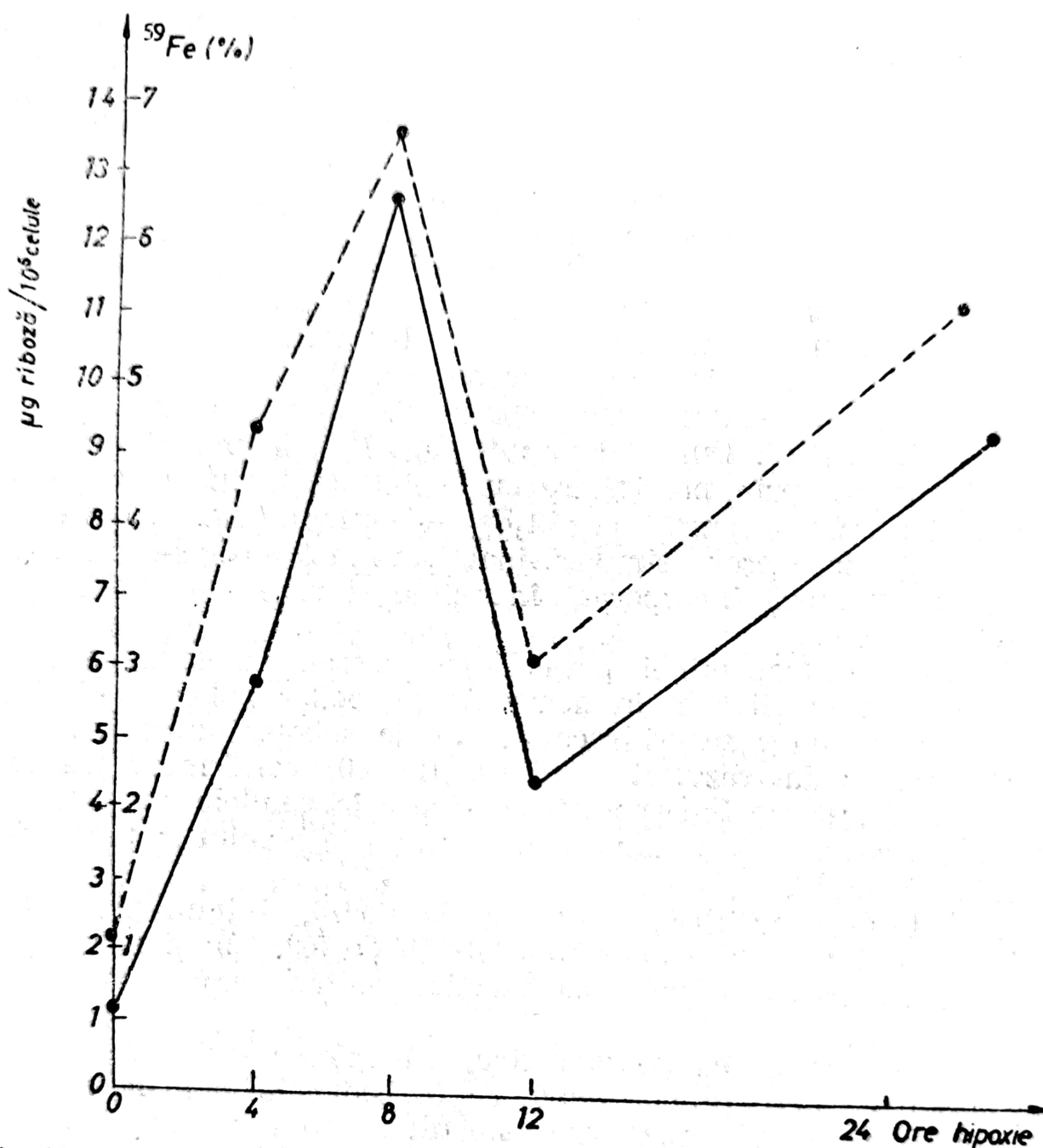


Fig. 40. Dozarea *in vivo* a eritropoetinei din serul hipoxic de șobolan prin testul incorporării de riboză în celulele roșii medulare de șoarece (---) comparativ cu testul incorporării ^{59}Fe în eritrocitele șoarecilor policitemici (—) (s-a injectat 1 ml ser hipoxic animal i.p.).

matice este relativ strânsă, astfel că viteza de incorporare a ribozei poate da informații cantitative privind concentrația hormonului. Dinamica bifazică a eritropoetinei în serul hipoxic este confirmată atât de datele citate cât și de dozarea eritropoetinei, prin metoda incorporării ^{59}Fe .

Acțiunea stimulatorie a eritropoetinei asupra absorbției de riboză de către celulele medulare ale șoarecilor hipoxici sau injec-

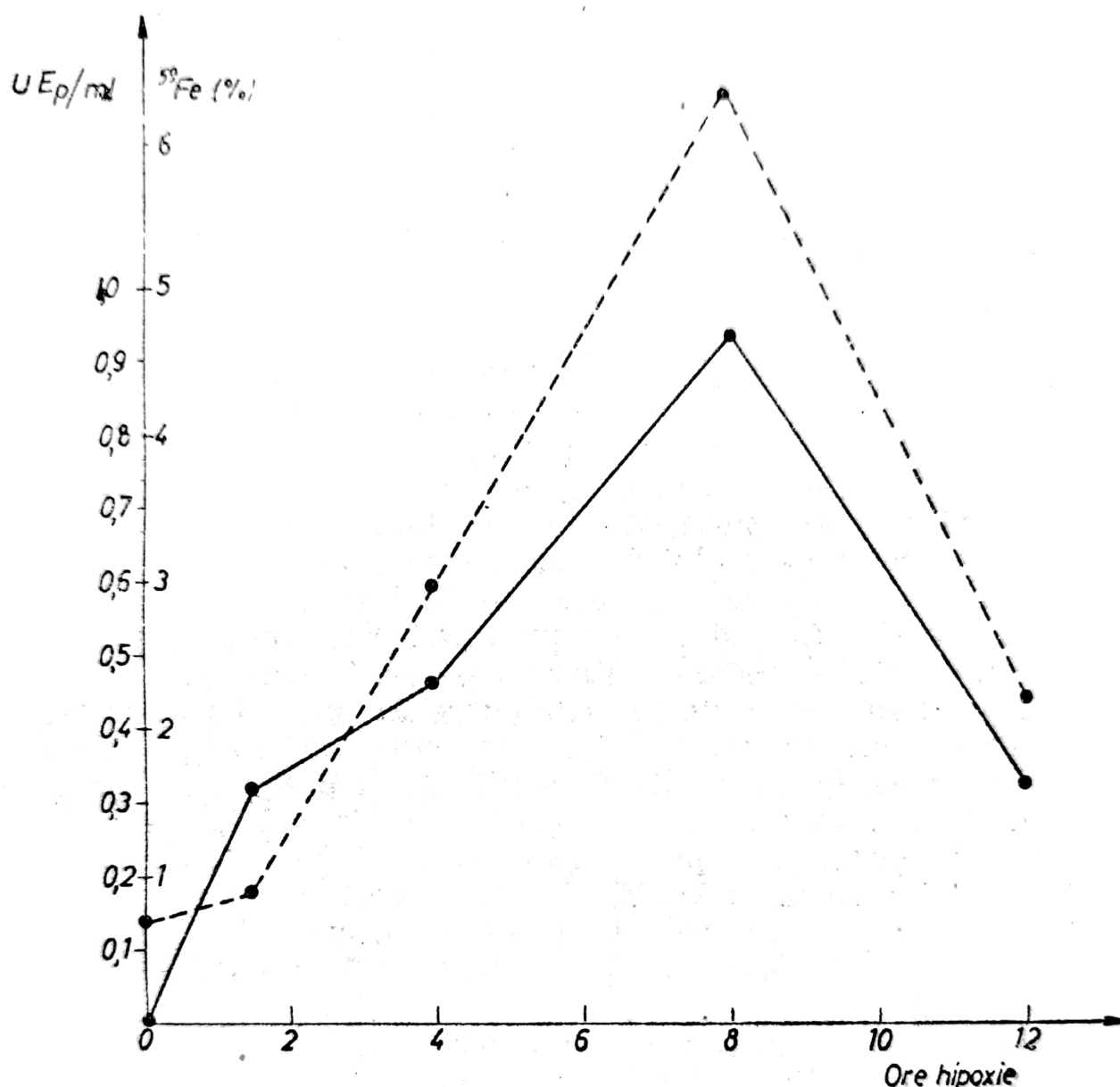


Fig. 41. Dozarea *in vitro* a eritropoetinei din serul hipoxic de șobolan prin testul absorbției de riboză în eritrocite (—), comparativ cu testul incorporării ⁵⁹Fe (---).

tați cu ser hipoxic sau cu eritropoetină purificată, a fost interpretată de autori, inițial, ca o consecință a creșterii sintezei de ARN — efectul biochimic cel mai bine cunoscut al eritropoetinei și care stă la baza proprietății sale de stimulare a eritropoezei. Ulterior, s-a constatat însă (Baciu, Ivanof, Pavel, 1980) că eritrocitele de șoarece și șobolan răspund în același mod la eritropoetină ca și suspensia medulară, mărandu-și consumul de riboză, proporțional cu doza de hormon. Apare deci că activarea consumului de riboză prin eritropoetină nu este legată exclusiv de creșterea sintezei de acizi nucleici, putînd avea cel puțin, în cazul eritrocitelor, și un alt mecanism.

Pentru a lămuri dacă eritrocitele incorporează riboză sub acțiunea eritropoetinei s-au efectuat experiențe pe ser, plasmă și eritrocite de șobolani expuși hipoxiei hipobare de 0,45 Atm. timp de 90 minute, 4, 8, 12 ore. S-a lucrat pe grupe de 6—8 animale, dintre care un lot a servit drept martor. Tehnica de dozare a absorbției de riboză în eritrocite a fost inițial aceeași cu metoda descrisă pentru celulele medulare, exprimarea rezultatelor făcându-se în μg riboză absorbită/10 mgHb.

Urmărind incorporarea ribozei în eritrocitele șobolanilor hipoxiați diferite intervale de timp, paralel cu dozarea eritropoetinei plasmatice prin testul incorporării ^{59}Fe , s-a obținut, în ambele cazuri, curba tipică de creștere progresivă a absorbției de riboză în eritrocite, respectiv a incorporării ^{59}Fe , cu maxim la 8 ore și scăderea, la 12 ore. De asemenea, injectarea intraperitoneală a șobolanilor cu eritropoetină purificată a determinat, în 4—5 ore de la injectare, creșterea consumului de riboză eritrocitară.

Pentru a răspunde la întrebarea — dacă stimularea consumului eritrocitar de riboză se datorește prezenței eritropoetinei și nu reprezintă un efect secundar al hipoxiei — s-a încercat transpunerea metodei de dozare pe sisteme eritrocitare *in vitro*. La o suspensie 1:1 de eritrocite normale în ser fiziologic s-a adăugat ser sau plasmă hipoxice, de la șobolanii menținuți la barocameră timp de 90 minute 4,8 și 12 ore sau eritropoetină purificată în concentrații de 0,02; 0,05 și 0,1 UEp/probă. După o incubare de 60 minute la 37°C în mediu Hanks 0,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ riboză, dozând riboză absorbită, s-au obținut aceleași creșteri ale incorporării, proporționale cu doza de hormon adăugată sau cu aceea determinată în serul hipoxic cu ^{59}Fe (fig. 42 b).

Deoarece consumul de riboză poate fi activat prin eritropoetină, numai în cazul eritrocitelor integre (hemolizatele nu răspund la acțiunea hormonului), s-a considerat că efectul eritropoetinei este consecința unui fenomen de membrană. S-a admis că membrana eritrocitelor animalelor martor este săracă în eritropoetină și deci capabilă de a lega o anumită cantitate de hormon, în vreme ce eritrocitele animalelor hipoxice au membrana „încărcată” cu eritropoetină, fixînd, în continuare, mai puțin din eritropoetina adăugată *in vitro*. În acest caz, punerea în contact a unui ser hipoxic cu eritrocite normale va determina o pierdere mai mare a activității de stimulare a serului, comparativ cu efectul aceluiași ser incubat cu eritrocite hipoxice. Rezultatele acestor investigații sînt prezentate în fig. 42.

Testările s-au efectuat pe eritrocite normale 250 μl suspensie în ser fiziologic, căreia i s-a adăugat 200 μl ser: a) normal b) hipoxic,

c) hipoxic preincubat 30 de minute cu eritrocite hipoxice, d) hipoxic preincubat 30 minute cu eritrocite normale. Coloana e reprezintă consumul de riboză al eritrocitelor normale care au stat în contact cu serul hipoxic.

Din consumul de riboză al acestor probe (eritrocite normale = 2,2; ser hipoxic = 7,15; ser hipoxic după preincubare pe eritrocite hipoxice = 5,85; ser hipoxic după preincubare pe eritrocite normale = 3; eritrocite normale după preincubare cu ser hipoxic = 4,55 μg riboză/10 mgHb), rezultă că serul hipoxic pierde o parte din activitatea sa stimulatorie după incubarea cu eritrocite normale, acestea, în schimb, devenind active din punctul de vedere al metabolismului ribozei. De asemenea, se constată că eritrocitele hipoxice nu mai pot fixa cantități însemnate de eritropoetină din serul hipoxic, acesta păstrându-și aproape integral capacitatea stimulatorie.

Demonstrarea adsorbției de eritropoetină pe membranele eritrocitare duce la concluzia că în sânge acest hormon poate să se găsească repartizat atât în plasmă cât și pe eritrocite. Ținând cont de faptul că volumul globular variază în stările de anemie sau policitemie în raport cu cel plasmatic, se poate presupune că și repartizarea eritropoetinei va fi influențată de raportul plasmă/volum globular. În acest caz, devine necesar ca în dozările de eritropoetină să se țină cont și de valoarea hematocritului. Unele date experimentale mai vechi (Adamson 1968, Adamson și Finch 1968; Hammond și colab., 1962, 1968) au descris existența unei relații inverse între valoarea hematocritului și concentra-

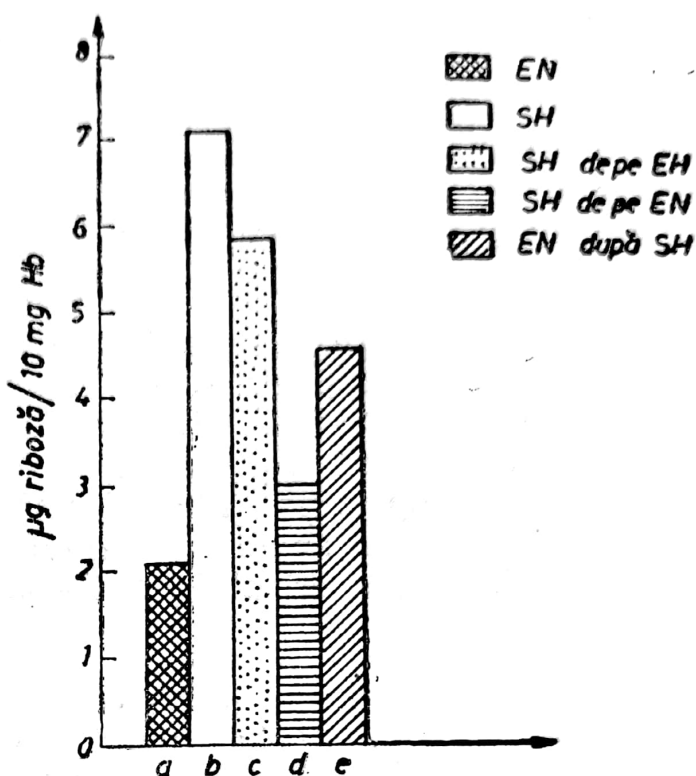


Fig. 42. EN = absorbția de riboză a eritrocitelor normale. SH = absorbția de riboză a eritrocitelor normale în prezența serului hipoxic. SH de pe EH = Absorbția de riboză a eritrocitelor normale în prezența serului hipoxic ținut în prealabil în contact cu eritrocite hipoxice. SH de pe EN = absorbția de riboză a eritrocitelor normale în prezența serului hipoxic ținut în prealabil în contact pe eritrocite normale. EN după SH = absorbția ribozei în eritrocitele normale care au fost în contact cu serul hipoxic.

ția eritropoetinei urinare, arătînd că eritropoetina poate fi pusă în evidență în ser și urină numai atunci cînd valoarea hematocritului ajunge la 30%. De asemenea, autorii au constatat că subiecții policitemici posthipoxici excretă cantități crescute de hormon numai atunci cînd sînt supuși unor sîngerări repetate prin care se readuce hematocritul la valori normale. Faptul că într-o serie de cazuri de eritrocitoze, cum sînt bolile cronice pulmonare, cardiace, eritrocitoze asociate cu neoplasm, eritrocitoze de natură endocrină, titrul eritropoetinei plasmatice este scăzut, este explicat fie prin metabolizarea mărită a eritropoetinei fie datorită reducerii formării ei (R. Alexanian, 1977, A. J. Erslev, 1977, în Fisher, 1977).

Studiînd (Baciu, Ivanof, Prodan, Pavel, 1979) repartizarea eritropoetinei între plasmă și eritrocite în funcție de hematocrit la animale anemiate treptat timp de 5 zile s-a constatat că la valori ale hematocritului de 44—35%, creșterea concentrației de

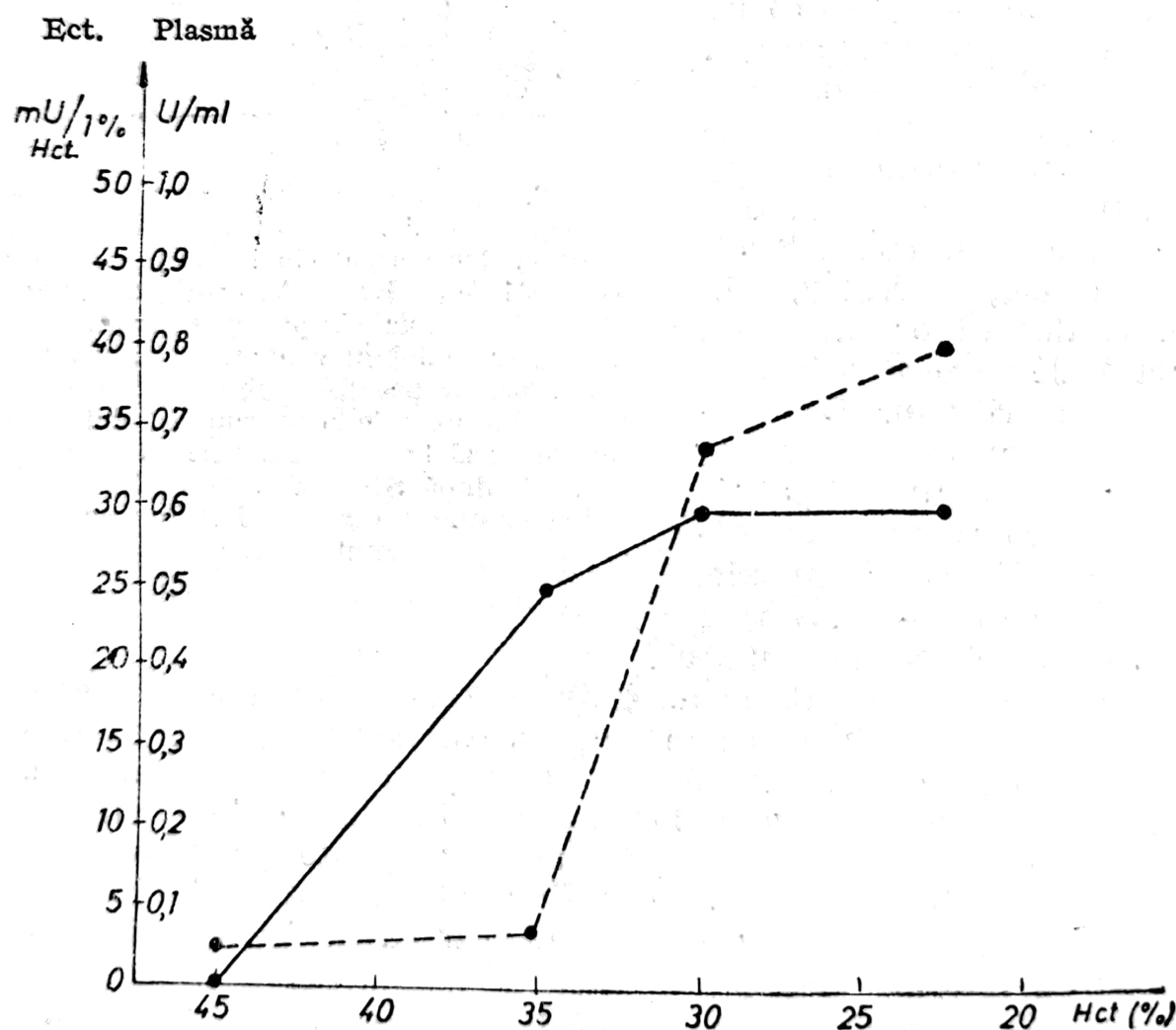


Fig. 43. Repartizarea între plasmă (---) și eritrocite (—) a eritropoetinei formate în cursul anemierii treptate a șobolanilor normali timp de 5 zile.

eritropoetină se reflectă atât în rata absorbției de riboză în eritrocite cât și în valorile incorporării ^{59}Fe determinate din plasmă. Sub un hematocrit de 35%, eritropoetina se găsește în concentrații mai mari în plasmă, dozările pe eritrocite nemaieexprimând concentrația reală a hormonului din sânge.

În unele cazuri de policitemii la om (Ivanof, Mureșan, 1980) (cardiopatie ischemică, cord pulmonar cronic), s-a constatat că eritrocitele prezintă un metabolism crescut al ribozei față de normal asemănător cu cel determinat de aditia *in vitro* a eritropoetinei. La fel, injectând 9 UEp/animal unor șobolani normali policitemizați prin hipertransfuzare pînă la un hematocrit de 62% s-a găsit că în vreme ce eritrocitele prezintă un consum de riboză crescut cu 212% față de normal, testarea plasmei nu indică prezența eritropoetinei. După o sîngerare pînă la un hematocrit de 54,4% eritropoetina apare și în plasmă.

Rezultatele acestor investigații privind adsorbția eritropoetinei pe eritrocite și, în raport de aceasta, influențarea absorbției de riboză în eritrocite, justifică presupunerea instituirii unei tehnici biochimice de dozare a eritropoetinei *in vitro* bazată pe aceste procese. Tehnicile actuale, atât *in vitro* cât și *in vivo*, descrise la un alt capitol al acestei monografii, sînt laborioase, necesită un timp îndelungat pentru executare și reactivi care nu sînt întotdeauna la îndemîna oricărui laborator. Tehnica propusă în final, pentru dozarea eritropoetinei, este următoarea (Baciu, Ivanof): la o suspensie de 200 μl eritrocite (de om, șoarece sau șobolan normal) în NaCl 0,156 M— $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \leftrightarrow 20 \text{ mM}$ ($\text{pH} = 7,4$), cu un hematocrit de 40—60%, se adaugă o cantitate de 25—50 μl ser sau plasmă de testat. După o preincubare de 10 minute la 37° , se adaugă 1000 μl soluție tampon, ce conține 0,66 μmoli riboză/ml, și se continuă incubarea timp de 60 minute. După separarea eritrocitelor prin centrifugare la 3000 r/min, 30 minute, din supernatant se dozează riboza rămasă neconsumată cu reactivul Bial. Scăzînd cantitatea de riboză găsită din valoarea unei probe similare efectuată cu ser hiperoxid, se obține consumul de riboză al suspensiei eritrocitare determinat de eritropoetină. Această valoare se raportează la cantitatea de hemoglobină a suspensiei (exprimare la 10 mgHb) apoi se traduce în unități de eritropoetină cu ajutorul unei curbe de etalonare efectuată cu eritropoetină standard.

Deoarece răspunsul eritrocitar la acțiunea eritropoetinei este funcție nu numai de concentrația de hormon, ci variază și cu densitatea suspensiei pe care se efectuează testarea (respectiv hematocritul suspensiei), se aduce o corecție prin înscrierea curbei de etalonare cu o aceeași cantitate de eritropoetină la mai multe valori

ale hematocritului. În acest mod se obțin unități de eritropoetină per unitate de hematocrit, valoare care, înmulțită cu hematocritul probei, va da unitățile per probă.

Datorită creșterii răspunsului eritrocitar invers proporțional cu valoarea hematocritului suspensiei, sensibilitatea metodei poate fi modificată în sensul creșterii ei, la hematocrite mici, sau micșorării sensibilității, atunci când proba de testat conține cantități mari de eritropoetină. Cantitatea minimă ce poate fi testată este de 10 mU/probă.

EFFECTUL ERITROPOETINEI ASUPRA DEBITULUI CIRCULATOR AL MĂDUVEI OSOASE

Efectul eritropoetinei asupra măduvei osoase constă în declanșarea mitozelor celulei sușe pluripotențiale sau angajată eritroid. În același timp cu activarea diviziunilor celulare și a diferențelor celulelor în măduvă s-a pus în evidență o creștere a sintezei acizilor nucleici care explică procesele precedente. Michelsen a descris la iepuri „in situ”, în timpul reticulocitozei provocate cu fenilhidrazină, o însemnată creștere a debitului circulator medular în artera aferentă a femurului.

Baciu, Derevenco, Pavel (1973), în cercetări asupra modificărilor debitului circulator al măduvei osoase sub acțiunea eritropoetinei endogene și exogene, au utilizat ca sursă de eritropoetină serul iepurilor anemiați cu fenilhidrazină, având o activitate eritropoetică de 3 U/ml. Ser inactiv, lipsit de eritropoetină, a fost obținut de la iepurii posthipoxici policitemici. Eritropoetina a fost extrasă din pseudoglobulinele fracțiunii II. Șobolanii au fost împărțiți în 11 grupe:

- 1: animale de control;
- 2—5: au fost utilizate pentru a produce o secreție endogenă de eritropoetină la o hipoxie hipobară de 0,5 atm. timp de 4, 8, 12 și 24 ore;
- 6: șobolani de control injectați cu ser fiziologic;
- 7: șobolani de control injectați cu pseudoglobuline inactive, cantitatea totală a pseudoglobulinelor injectate s.c. reprezenta 2% din greutatea corporală;
- 8—11: șobolani tratați cu eritropoetină 7 U/100 g greutate corporală s.c. Animalele au fost sacrificate la 4, 7, 12 și 24 ore după administrarea eritropoetinei, pentru măsurarea debitului sanguin din măduva osoasă.

Determinările debitului sanguin relativ al măduvei osoase s-a făcut în ambele femure, în raport de repartiția ^{86}Rb , după tehnica lui Sapirstein prelucrată pentru animale neanesteziate (De-revenco). Cantitatea măduvei recoltate, între 20—80 mg, a fost stabilită prin cântărirea diafizelor după evacuarea conținutului medular. Rezultatele s-au exprimat în impulsuri/100 mg țesut și ca repartiție procentuală între doza injectată și cantitatea găsită în țesuturi (Tabel X).

TABELUL IX

VALORI ALE CIRCULAȚIEI MĂDUVEI OSOASE LA ȘOBOLAN

În hipoxie

<i>Lot</i>	<i>n</i>	% <i>Incorporare de ^{86}Rb</i>	<i>P</i>	(%)
Martori	10	$0,056 \pm 0,009$		
Hipoxia 4 ore	7	$0,056 \pm 0,010$		0
8 ore	9	$0,052 \pm 0,008$		— 7
12 ore	8	$0,089 \pm 0,011$	<0,05	+59
24 ore	10	$0,051 \pm 0,012$		— 8

n = numărul animalelor;

% = modificări procentuale în comparație cu martorii

După administrare de eritropoetină

<i>Lot</i>	<i>n</i>	% <i>Incorporare de ^{86}Rb</i>	<i>P</i>	(%)
Martori	7	$0,0103 \pm 0,0018$		+ 32
Eritropoetină după 4 ore	8	$0,0137 \pm 0,0017$		
Martori	7	$0,0079 \pm 0,0018$	<0,05	+ 70
Eritropoetină după 8 ore	6	$0,0135 \pm 0,0026$		
Martori	7	$0,0081 \pm 0,0016$	<0,01	+110
Eritropoetină după 12 ore	7	$0,0170 \pm 0,0020$		
Martori	5	$0,0093 \pm 0,0020$		— 5
Eritropoetină după 24 ore	6	$0,0080 \pm 0,0025$		

Rezultatele cercetărilor asupra efectului unei hipoxii hipobare (producere endogenă de eritropoetină) asupra debitului circulator medular sînt reproduse în tabelul X. Din acesta reiese că o hipoxie de 4 și 8 ore nu determină modificări semnificative ale circulației medulare. După 12 ore se constată o creștere statistic semnificativă a irigației cu cca 60%. După 24 ore, irigația medulară revine de la valorile crescute la normal. Efectele asupra șobolanilor tratați cu eritropoetină sînt date în tabelul X, la 8 și 12 ore; după injecția de eritropoetină se produce o creștere exprimată (70—110%) a irigației sanguine relative a măduvei hematogene. După 24 ore de la aplicarea eritropoetinei nu se mai poate înregistra nici un efect asupra irigației medulare.

Extractele de ser inactiv nu produc creșterea circulației în măduvă. Rezultă că eritropoetina produce o creștere însemnată a debitului circulator medular. Influența sa nu se exercită direct asupra vaselor măduvei osoase sau asupra mecanismelor vasomotorii nervoase, întrucît creșterea debitului circulator medular survine numai după 4 ore și după 12 ore își atinge valoarea maximă. Efectul hormonului, al cărui timp de înjumătățire este de 128 minute, apare deci asupra circulației medulare numai după ce acesta a dispărut din circulație. Irigația măduvei crește sub influența hipoxiei mai puțin decît după administrarea unică a unei singure doze masive de eritropoetină. Acest fapt poate fi explicat atît prin eliberarea continuă de eritropoetină endogenă cît și printr-un efect vasodilatator general, determinat de hipoxie. Există un paralelism între acțiunea eritropoetinei asupra irigației sanguine medulare, sinteza de acizi nucleici din măduvă și proliferarea celulelor seriei roșii medulare. Creșterea debitului circulator al măduvei ca urmare a proliferării capilarelor medulare este exclusă întrucît cantitatea de sînge care irigă măduva osoasă se normalizează după 24 ore.

TESTAREA FUNCȚIEI MĂDUVEI HEMATOPOETICE

În cercetări publicate în anul 1961, Baci, Rosenfeld, Dorofteiu, Telia, Rusu și Cupărescu au analizat efectul radioprotector, preventiv și terapeutic al eritropoetinei. S-a stabilit că după iradierea totală a șobolanilor cu o doză unică subletală de Rx (590 r, cîmp deschis, dist. focală 40 cm, 160 kV și 10 mA, filtru 0,5 mm Cu), administrarea unui extract din ser de iepure anemiat cu fenilhidrazină, bogat în eritropoetină, patru zile con-

secutiv, începînd cu a 6-a zi de la iradiere, nu influențează letalitatea lotului tratat, în raport cu martorii iradiați în aceleași condiții, netratați însă cu eritropoetină. Șobolanii iradiați cu cinci doze consecutive de 200 r (cîmp deschis, distanță focală 40 cm, 160 kV și 10 mA, filtru 0,5 mm Cu), tot a doua zi, în total 1000 r, și tratați după ultima iradiere la șase zile, în același mod, cu aceeași doză de extract seric conținînd eritropoetină, prezintă o curbă de letalitate ca și a martorilor iradiați în condiții similare, netratați însă cu eritropoetină.

Este de remarcat că șobolanii din lotul iradiat supraviețuiesc și răspund la eritropoetină după iradiere, prin reticulocitoză și poliglobulie, pe cînd cei cu insuficiență medulară, incompatibilă cu supraviețuirea, nu răspund la eritropoetină.

Eritropoetina nu are deci efect terapeutic după iradiere. Prezența răspunsului eritrocitar la eritropoetină ar putea constitui însă un criteriu de evidențiere a rezervelor de care mai dispune organul hematopoetic după iradiere.

Între timp, Gurney (1962), Porteous și colab. (1965) și Kilbridge și Fried (1968) au arătat că răspunsul la eritropoetină al șoarecilor policitemici iradiați precum și capacitatea măduvei hematopoetice a acestora de a coloniza, descreșc proporțional cu doza utilizată pentru iradiere.

Baciu, Pavel, Vasile, Vitebski (1970), pe mai multe loturi de șoareci, au studiat răspunsul eritrocitar la eritropoetina exogenă. Leziunile medulare au fost induse prin cinci iradiieri consecutive, pentru a elimina influența intervalului de timp de la iradierea unică pînă la testare și a reproduce astfel efectele agenților patogeni mielotropi, care, în condiții naturale, sînt repetitive și de durată. Răspunsul eritrocitar la eritropoetină a fost apreciat prin utilizarea simultană a testului reticulocitozei periferice și cel al incorporării fierului radioactiv în eritrocite, cu controlul simultan al sîngelui periferic (hemoglobină, hematocrit și număr de eritrocite). Șoarecii au fost grupați în cinci loturi de cîte 60 animale, cu excepția lotului I, de control (neiradiat) (0 r) format din 40 animale. Loturile II—V au fost iradiate, fiecare cu altă doză de Rx, în cîte cinci ședințe, din două în două zile, în total iradierea avînd o durată de zece zile. În ziua 11-a, loturile I—V au fost împărțite fiecare în două grupe egale, din care una a fost păstrată pentru stabilirea valorilor de bază. Animalele din a doua grupă au fost injectate i.m. zilnic cu trei doze de 0,4 U eritropoetină, în total 1,2 UCo.

În ultima zi de administrare a eritropoetinei (ziua 13), fiecare șoarece a primit subcutan ^{59}Fe 0,2 μc . În ziua a 14-a, la 20 ore

după injectarea ^{59}Fe , toți șoarecii au fost sacrificați, recoltându-li-se sînge pentru examinări.

Iradierea s-a făcut la Institutul de Radiologie din Cluj, sub controlul Prof. Dr. Vasculescu, cu aparatul Stabilivolt, Siemens, cu 160 kV, 10 mA, distanță focală 40 mm, cîmp deschis, filtru de cupru de 0,5 mm, cu un debit de 50 r/minut. În cursul iradierii, animalele au fost plasate toate în aceeași poziție, într-o cutie circulară de material plastic în rotație. În tabelul X sînt date dozele de iradiere.

TABELUL X

DOZELE DE IRADIERE ALE LOTURILOR DE ȘOARECI ÎN EXPERIENȚĂ

<i>Lotul nr.</i>	<i>Nr. șoarecilor</i>	<i>Doza unică rad.</i>	<i>Doza totală (5 iradiieri) rad.</i>	<i>Observații</i>
I	40	0	0 r	Doza unică de iradiere a fost aplicată de 5 ori, la intervale de 2 zile.
II	60	50	250 r	
III	60	100	500 r	
IV	60	150	750 r	
V	60	200	1000 r	

Eritropoetina utilizată a fost extrasă din ser de iepure anemiat cu fenilhidrazină HCl și fracționat prin precipitări succesive cu metanol la rece, și cromatografierea pe coloană de DEAE celuloză și recromatografierea fracțiunii active pe coloană de DEAE Sephadex. Prin aceste procedee, care au fost descrise detaliat în alte lucrări (1959, 1964, 1968), se realizează, în final, o concentrare a activității biologice, raportat la conținutul în proteine al plasmei de la care s-a pornit, de 2300 ori. Extractul are o activitate specifică de 20 U/mg. Administrat șoarecilor în doze zilnice de 20 μg (0,4 U) pe zi și animal, trei zile consecutiv, în doză totală de 60 μg (1,2 U), produce un răspuns eritrocitar foarte semnificativ (lotul I neiradiat, 0 r).

Efectul eritropoetinei este prezent după iradiere cu doze totale de 500 r, pentru ca la 750 r și 1000 r, din cauza lezării măduvei, reticulocitele, reduse la valori apropiate de zero, să nu mai crească semnificativ după eritropoetină. (fig 44 a).

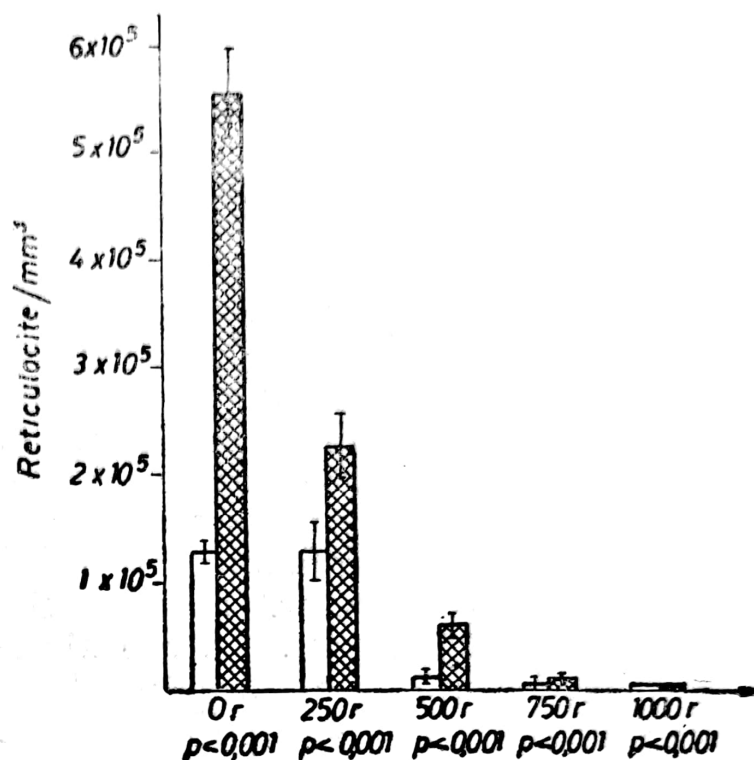
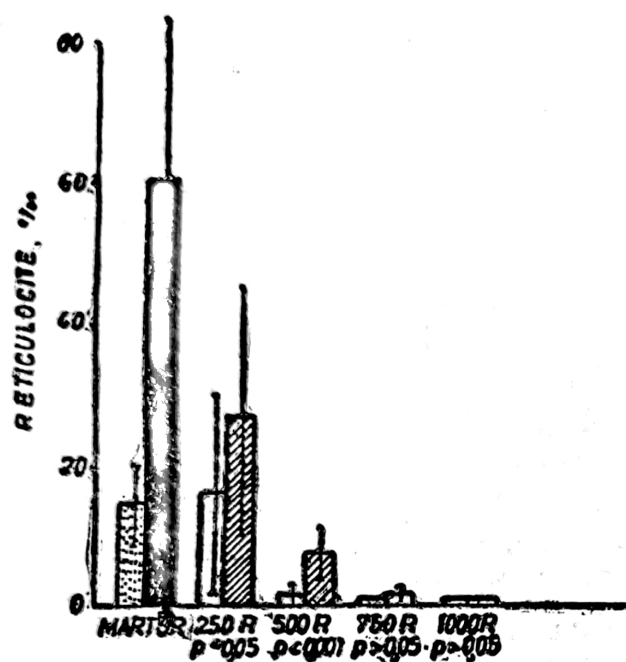


Fig. 44. a. Variațiile medii ale numărului de reticulocite exprimate la ‰, în funcție de doza de iradiere.

b. Variațiile medii ale numărului de reticulocite, exprimate la mm^3 de sînge, în funcție de doza de iradiere.

Coloanele albe = înainte de administrarea eritropoetinei;
Coloanele hașurate = după administrarea eritropoetinei (în aceleași condiții ca la fig. 44 a).



martori înainte de administrarea eritropoetinei;



la 48 ore după administrarea a 0,4 U/animal eritropoetină, în trei doze zilnice (numărarea reticulocitelor s-a făcut la 48 ore după administrarea celei de a treia doze de hormon).



animale iradiate înainte de administrarea eritropoetinei și



după

Rezultatele apar mult mai evidente dacă reticulocitele circulante se exprimă în valori absolute, raportat la volum de sînge (fig. 44 b).

La fel ca și creșterea reticulocitelor circulante, procentul ^{59}Fe incorporat în eritrocite scade proporțional cu creșterea dozei de iradiere. Scăderea realizează, și în cazul reticulocitelor circulante, o

curbă exponențială. Dispersia valorilor la incorporarea ^{59}Fe este însă mai mare, comparativ cu răspunsul reticulocitar.

Iradierea șoarecilor cu doze fracționale a provocat leziuni pe cât posibil limitate la celulele hematopoetice sușe, cele mai sensibile la radiații. Astfel, celulele sușe medulare sînt sensibile chiar la 5 r, în expuneri corporale totale. Alpen (1967) a calculat pentru șoarecii femele din sușa LAF_1 că $\text{LD}_{60/30}$ este de 941 r. După McCulloch și Till (1960), pentru celulele măduvei osoase de șobolan in vitro, este de 105 ± 24 r, de 87 r, după Schneider și Whitmore (1963), iar Davis și colab. (1961) stabilesc că, după iradierea șoricilor cu 130 r, conținutul în DNA al femurilor se reduce cu 50% în următoarele 28 ore. Importantă e și constatarea lui Blackett (1967) că iradierea zilnică a șobolanilor cu 45 r zilnic, timp de 15 săptămîni, nu este urmată de modificări semnificative ale eritrocitelor. Fried și colab. (1968) arată că șoarecii iradiați cu 800 r, expuși la hipoxie de $1/2$ atmosferă în barocameră, nu reacționează prin formarea de colonii hematopoetice endogene în splină, care, la șoarecii cu un membru protejat de iradiere, sînt foarte numeroase. Dacă animalul e iradiat global cu 800 r, iar segmentul periferic numai cu 200 r, în splină apar colonii endogene hematopoetice mai reduse care pot fi numărate. Rezultă deci că măduva osoasă iradiată *in vivo* unic, cu 200 r, păstrează capacitatea de regenerare și repopulare.

Blackett și Roylance (1956) găsesc, după o doză unică de 200 r, capacitatea măduvei osoase de șobolan de a repopula redusă la 10% din valoarea normală, pentru următoarele opt zile, dar precursorul eritropoetic și capacitatea de regenerare eritroidă scade numai cu 25% și revine la normal după cinci zile.

După aceste cercetări, prezența celulelor sușe nu ar fi necesară pentru eritropoeză și eritropoetină și ar acționa nu asupra unei celule sușe primordiale, ci asupra unei celule angajate eritroid.

Doze repetate, între 50 și 200 r, acționînd oarecum selectiv asupra celulelor sușe hematopoetice — și numai în mică măsură asupra structurilor vasculare medulare (Huhn, 1967), — au provocat, pe prim plan, reducerea acestor celule în organele hematopoetice. Ca urmare, la o reducere mai moderată a celulelor sușe (iradiere cu 5—50 și 5×100 r), cu păstrarea capacității reactive eritropoetice, reticulocitoza crește după iradiere, ca expresie a secreției endogene de eritropoetină. Reducerea în mai mare măsură a acestor celule, prin doze mai mari de iradiere (5—150 și 5×200 r), face să diminueze reticulocitele circulante sub valori normale. Răspunsul reticulocitelor și incorporarea procentuală a ^{59}Fe în hematii, provocate de eritropoetina exogenă, descresc însă în mod semnificativ

de la diferența maximă, constatată la martori, în sens invers cu doza de iradiere, pînă la abolirea sa la iradierea cu 5×200 r.

O importantă întrebare este dacă eritropoetina acționează asupra celulei sușe primordiale sau asupra unei celule mai diferențiată, angajată eritroid. Asupra acestei probleme există un bogat material experimental, cu argumente factice și interpretări favorabile ambelor teze. Dacă primele cercetări asupra mecanismului de acțiune a eritropoetinei (Erslev, 1959; Baci u, 1961, 1962; Goldwasser și colab., 1962, Lajtha 1962) au arătat că eritropoetina acționează stimulator asupra celulei sușe primordiale, Blackett și Roylance, citați anterior, precum și alți autori susțin efectul eritropoetinei asupra unui precursor angajat eritroid. Date mai vechi (Baci u și colab., 1961, 1962) pledează pentru efectul eritropoetinei asupra celulei sușe, cît și asupra formelor mai diferențiate ale acesteia, întrucît iradierea unică semiletală (550 și 650 r) a șoricilor, la 12 și 24 ore după administrare de eritropoetină, deci în fazele postmitotice, diminuează letalitatea în primele zece zile de la iradiere. Așa cum se știe, în primele zile după iradiere, animalele mor prin infecții de origine, mai ales intestinală. Înseamnă că, acționînd asupra celulei sușe, generatoare inclusiv a seriilor granulocitare, prin protejarea acesteia, eritropoetina asigură mecanismul granulocitar al apărării. Protejarea, inclusiv a sistemului leucocitar, prin eritropoetina administrată înainte de iradiere, argumentează acțiunea sa asupra celulei sușe. Reiese deci că testul răspunsului eritrocitar la eritropoetină permite investigarea rezervelor medulare în celule sușe primordiale.

Rezultate similare cu cele expuse au obținut și Kilbridge și Fried (1968) în investigații pe șoareci pletorici, iradiați într-o singură ședință cu 36, 72, 100 și 150 r. În lucrarea citată, s-a arătat că răspunsul eritrocitar la eritropoetină este invers cu doza de iradiere. La șoricelii pletorici (hematocrit peste 55%), secreția de eritropoetină endogenă este blocată. Din acest motiv după dozele mici de Rx, care la șobolanii pletorici nu mai stimulează producția endogenă de factor eritropoetic, răspunsul eritrocitar are o mai mare amplitudine, decît în experiențele noastre.

În explicarea acestui fenomen, De Gowin și Kretschmar (1967) au calculat că durata de timp a unui ciclu celular (G 1), următor administrării de eritropoetină, se reduce și au arătat că celulele care proliferază rapid sînt insensibile la eritropoetină.

Rezultă deci că răspunsul medular la eritropoetină scade în anemiile cu reacție regenerativă limitată prin reducerea procentului celulelor sușe. Răspunsul la eritropoetină este foarte mic după iradiere mai intensă (5×200 r), cînd reticulocitele circulante anterior

administrării eritropoetinei prezintă valori sub cele normale. Reducerea răspunsului eritrocitar este invers proporțională cu numărul de celule sușe rămase întregre după iradiere în structurile hematopoetice.

Răspunsul la eritropoetină ar putea constitui un test de explorare a celulelor sușe hematopoetice. Examinarea exclusiv sub aspect morfologic a materialului prelevat prin puncție dintr-un sector limitat al măduvei osoase, care poate diferi de restul țesutului mielopoetic, ne va da indicii parțiale asupra capacității sale funcționale. Reactivitatea la eritropoetină ar putea constitui dimpotrivă un test funcțional global, ce se adresează capacității de supleere a tuturor celulelor sușe, întregre, fiind din aceste motive mult mai fidel, ca valoare aplicativă terapeutică și prognostică și mai puțin nociv pentru bolnav. Evaluarea răspunsului prin stabilirea reticulocitelor la mm^3 este suficient de exactă. Posibilitățile de aplicare clinică a testului propus sînt însă deocamdată limitate de dificultatea obținerii eritropoetinei în cantități suficiente pentru asemenea investigații.

În concluzie, între doza de iradiere și amplitudinea răspunsului eritrocitar la eritropoetină există o reacție de proporționalitate inversă, exprimabilă sub forma unei curbe exponențiale.

În măsura în care eritropoetina acționează asupra celulei sușe pluripotențiale (Baciu și colab., 1961, 1962), răspunsul la eritropoetină poate constitui un criteriu de explorare a rezervei măduvei osoase în celule sușe. Cum o asemenea acțiune directă este exclusă în baza faptelor experimentale citate, (Sajthov, 1966), efectul radioprotector, inclusiv asupra protejerii seriei albe, descris de Baciu și colab. (1961), s-ar putea explica printr-un mecanism de reglare inversă a proliferării celulei sușe, în urma efectului stimulator al eritropoetinei asupra precursorului eritropoetin — sensibil al proeritroblastului.

FACTORUL INHIBITOR AL ERITROPOEZEI

În reglarea umorală a eritropoezei intervine pe lângă eritropoetină și un factor inhibitor. Descoperirea factorului inhibitor al eritropoezei este de dată mai recentă. Krzymowski și Krzymowska (1962) îl separă din plasma oilor hipertransfuzate. Doi ani mai târziu, Reynafarje (1964) îl evidențiază în plasma oamenilor, în perioada de revenire după o staționare îndelungată la mare altitudine.

Izolarea factorului inhibitor al eritropoezei din plasmă.

Majoritatea cercetărilor separă factorul inhibitor din plasmă după metoda Borsook și colab. (1954), adică din fierberea plasmei la pH 5,5, timp de cinci minute. Procedul a fost folosit și la izolarea eritropoetinei. Baciș și colab. (1964), care au urmărit purificarea eritropoetinei din plasmă, în prima etapă prin precipitarea plasmei cu metanol la rece, au constatat că extractele din plasma unor animale, la care nu s-a respectat timpul pentru recoltarea sîngelui, avea efecte net inhibitoare. De aceea, metoda pentru prepararea eritropoetinei crude, a fost folosită de M. Dorofteiu, A. Olteanu și T. Pavel (1970) pentru izolarea factorului inhibitor. Ca sursă de factor inhibitor, autorii au recurs la plasma de iepure cu poliglobulie posthipoxică, recoltată la 4—5 zile după revenirea la normobarism. Plasma a fost precipitată cu metanol la rece după metoda Dubert și colab. (1953). Pseudoglobulinele extrase din fracțiunea II, administrate animalelor de experiență, au capacitatea de a suprima reacția eritrocitară caracteristică la hipoxia hipobară. Injectarea preparatului trei zile consecutiv, la animale în condiții de normobarism, determină scăderea eritrocitelor și reticulocitelor circulante, cîtă vreme serul integral sau cel fiert la pH 5,5 nu posedă efecte asemănătoare. Este o dovadă că tehnica folosită de autori reușește să izoleze mult mai bine factorul inhibitor, decît prin fierberea plasmei. S-a confirmat apoi constatarea altor cercetători, după care factorul inhibitor apare în plasmă abia la 72 ore

după inducerea policitemiei posttransfuzionale, sau după întreruperea expunerii la presiune scăzută, fără a se găsi pînă în prezent o explicație a fenomenului.

Condițiile de elaborare a factorului inhibitor.

Se cunosc mai multe procedee capabile să declanșeze secreția factorului inhibitor. Astfel, producția de factor inhibitor a fost provocată prin hiperoxie hiperbară, prin policemie posttransfuzională sau posthipoxică, prin injectare de albastru tripan, prin policemie posttransfuzională cu eritrocite care aveau hemoglobina blocată cu oxid de carbon sau transformată în metemoglobină.

Pornind de la constatarea lui L. Smith (1970) că o doză unică de fenilhidrazină de 3 mg administrată unui șoarece conferă animalului protecție față de o doză letală de raze X, aplicată la 7 zile după injectare, M. Dorofteiu, A. Olteanu, T. Pavel și M. Banea (1973) au urmărit măsura în care radioprotecția se datorește eritropoezei. În sângele animalelor injectate cu o doză unică de fenilhidrazină s-a constatat, într-a șaptea zi, prezența factorului inhibitor al eritropoezei. Prin intervenția fenilhidrazinei în aceleași condiții se poate provoca formarea de factor inhibitor și la iepure. Din experiențele făcute reiese că secreția factorului inhibitor are loc și la animalele cu un hematocrit redus.

S-a presupus că elaborarea factorului inhibitor în asemenea condiții ar reprezenta o reacție de răspuns la producția mărită de eritropoetină apărută în urma hemolizei cauzate de fenilhidrazină. Același colectiv a arătat că, la 7 zile după o doză unică de eritropoetină, are loc o deprimare a eritropoezei, iar, la 5 zile după o doză unică de factor inhibitor, o stimulare a eritropoezei. Se demonstrează astfel că între eritropoetina circulantă și factorul inhibitor se realizează un echilibru dinamic.

Proprietățile factorului inhibitor al eritropoezei.

Factorul inhibitor al eritropoezei este dializabil, ceea ce pledează pentru o greutate moleculară redusă, fapt demonstrat și de colectivul amintit anterior.

M. Dorofteiu, A. Olteanu și T. Pavel (1970) au constatat că factorul inhibitor al eritropoezei are proprietăți antigenice. Serul imun obținut față de extractul inhibitor, injectat la animalele normale sau policitemice, determină o reacție eritocitară semnificativă tradusă prin mărirea numărului de eritrocite și reticulocite periferice și prin creșterea incorporării ^{59}Fe în eritrocitele circulante. Este un argument pentru existența constantă a factorului inhibitor în sângele circulant, care, odată blocat, își validează acțiunea eritropoetică. Dealtfel, și în alte procese fiziologice cum

sînt coagularea, fibrinoliza etc., în sîngele circulant predomină factorii inhibitori.

Aceiași autori au evidențiat factorul inhibitor în plasma oamenilor sănătoși (în pseudoglobulinele fracțiunii IV, separate după tehnica lui Cohn, sau în pseudoglobulinele fracțiunii II, separate după tehnica lui Dubert). Lindemann (1976) semnalează prezența factorului inhibitor în urina normală.

Asupra mecanismului de acțiune a factorului inhibitor există două păreri, fie că inhibă direct celula sușe medulară, fie că împiedică acțiunea eritropoetinei, pentru ambele ipoteze existînd argumente experimentale convingătoare.

Secreția factorului inhibitor al eritropoezei în condiții patologice.

Pe un număr de 28 bolnavi cu cord pulmonar cronic s-a urmărit comportamentul factorilor umorali care reglează eritropoeza, înainte și după tratament (N. Olinic, A. Olteanu, M. Banea, T. Prodan, M. Dorofteiu, 1972). La lotul de bolnavi la care înainte de tratament predomina hipoxia asupra infecției s-au constatat, în sîngele circulant, mari cantități de eritropoetină. După un tratament adecvat, odată cu îmbunătățirea oxigenării țesuturilor, în sîngele bolnavilor apărea factorul inhibitor al eritropoezei. Detectarea factorului inhibitor al eritropoezei în timpul tratamentului bolnavilor cu cord pulmonar cronic și cu stare de hipoxie avansată, fără infecție pronunțată, este un indiciu umoral precoce al ameliorării clinice.

IMPLICAȚII CLINICE ALE ERITROPOETINEI

Relativ la discuția mai veche, dacă producerea de eritropoetină e un proces de necesitate, sau dacă este un proces continuu, perfecționarea tehnicilor de investigație a arătat că un nivel de hormon se găsește întotdeauna în sânge și că proporțional cu concentrația serică ea se excretă prin urină. La fel s-a apreciat că formarea de eritrocite este influențată de eritropoetină (Alexanian, 1966, 1973; Adamson și colab., 1966, 1968). Există, în general, un raport de proporționalitate între hipoxia tisulară și eritropoetina serică și urinară. Datorită adsorbției hormonului pe eritrocite, în urină se găsește aproximativ de 10 ori mai multă eritropoetină decât în ser, cantitatea din ser fiind din acest motiv invers proporțională cu valoarea hematocritului.

CREȘTEREA PRODUCERII DE ERITROPOETINĂ

Se întâlnește în condiții fiziologice și patologice.

Fiziologic, scăderea tensiunii parțiale a oxigenului determină o secreție mărită de hormon eritropoetic. Se realizează, astfel, mărirea la dublu a volumului globular la subiecții ce trăiesc la altitudine de 4500—5000 m, avînd o saturație a sîngelui arterial, de 80—85% O_2 (Murray, 1965). Apariția poliglobuliei de altitudine, după 8—14 zile, are ca urmare atenuarea răspunsurilor respirator și circulator la hipoxie. Readucerea subiecților la nivelul mării, determină, în 12 ore, o scădere exprimată a eritropoetinei, datorită hiperoxiei relative; hormonul devenind de nedetectat (Faura, 1969).

În condiții *patologice*, nivelul producerii de eritropoetină poate crește ca un mecanism adaptativ la hipoxia produsă în condițiile bolii primare. Astfel, eritropoetina crește în toate formele de anemii,

exceptând anemia din faza terminală a insuficienței renale, cea din hipogonadism sau din inflamație. Uneori se notează și în aceste boli creșteri neînsemnate. Creșterea eritropoetinei, cu deosebire în anemiile aplastice și în cele datorate lipsei de vitamină B₁₂, acid folic sau fier, constituie punerea în joc a mecanismului de reglare, la care seria roșie a măduvei osoase lezată primar, în anemia aplastică, sau aflată în carență de factori plastici și catalitici, nu mai e în măsură să răspundă la hormon. În acest mod, din cauza leziunii medulare, cu tot nivelul ridicat al eritropoetinei, eritropoeza rămîne redusă.

Relativ la modul de producere a aplaziei medulare pure a seriei roșii, K r a n t z (1970) a descris valori deosebit de ridicate ale eritropoetinei. Adăugarea de eritropoetină *in vitro* culturilor de măduvă a acestor bolnavi activează deseori sinteza hemoglobinei (K r a n t z, 1973). Întrucît, în unele cazuri, acțiunea eritropoetinei e inhibată cu IgG globulină de la acești bolnavi, s-a formulat explicația caracterului autoimun al bolii. Rezultate terapeutice bune cu substanțe imunosupresoare, în tratamentul unor anemii aplastice, vin în sprijinul acestei explicații.

În acest sens, a fost urmărit (B a c i u, D o r o f t e i u, Z. B a c i u, V a s i l e 1975) bolnavul F. D., bărbat de 60 ani, cu diagnosticul de aplazie eritroidă pură. Boala a început în 1973, cu o stare de fatigabilitate permanentă, palpitații, uneori cefalee. Se internează în spital unde i se stabilește diagnosticul de anemie aplastică și se instituie un tratament cu acid folic, vitamina B₆ și transfuzii cu masă globulară. În anul 1974, bolnavul face o hepatită epidemică pentru care este internat în Clinica de boli infecțioase timp de o lună. În cursul internării folosește medicamente anabolizante (testosteronul și DECA-Durabolimul). Deși simptomatologia se amendează după tratament, există numeroase recăderi în care apare o dispnee marcată la efort, palpitații, tahicardie, dureri precordiale constrictive, tulburări de vedere, zgomote auriculare.

Internarea la Cluj s-a făcut pentru a preciza dacă aplazia eritroidă nu este cauzată de absența secreției de eritropoetină. Testările făcute la internare, cînd eritrocitele erau 1.700.000/mm³ și hemoglobina 33% au evidențiat 0,64 U eritropoetină/ml urină și 2,2 U/ml ser (persoanele normale elimină 1,5—5,2 U/24 h) (A d a m s o n și colab., 1966, A l e x a n i a n R., 1969). Se stabilește diagnosticul de aplazie medulară. După transfuzii de 100 ml sînge, numărul eritrocitelor a crescut la 2.550.000/mm³ și Hb la 40% în schimb eritropoetina urinară a scăzut la 0,12 U/ml. Se constată deci o corelație inversă între producția de eritropoetină și eritrocitele circulante,

ceea ce demonstrează că secreția hormonului este reglată de necesitățile în oxigen ale țesuturilor ca și la persoanele normale.

În luna martie 1975, bolnavul este examinat și de Prof. Begemann (München), care constată o lipsă totală a eritroblaștilor din măduva osoasă, stabilind diagnosticul de aplazie eritroidă pură și recomandă ca tratament oximetolonul, steroid androgen anabolizant. Aproximativ la o lună și jumătate de la începutul tratamentului reticulocitele cresc la 26 chiar 35%, hematocritul de la 16% la 35% și Hb de la 6 g la 10,7 g%. Starea generală nu se ameliorează, însă, în mod corespunzător. La cca două luni de la începutul tratamentului cu Oximetolon apare prima reacție de intoleranță, care necesită întreruperea terapiei pentru cca patru săptămâni. Reacția se traduce prin tulburări nervoase de memorie, idee, vorbire, reducerea acuității vizuale și hipoacuzie. Reluarea tratamentului nu mai este în stare să corecteze tabloul hematologic și reticulocitele periferice nu depășesc proporția de 2%. La un interval de aproximativ o lună de tratament apar noi semne de intoleranță, caracterizate prin dureri abdominale în hipocondrul drept și stâng, subfebrilități, scăderi în greutate. Fenomenele se repetă încă o dată, la cca o lună după reluarea tratamentului.

Toate tulburările se grefează la un bolnav care, în copilărie, a avut anghină difterică, tuse convulsivă, parotidită epidemică, apoi, în perioada adultă, pneumonie cu pleurezie (TBC?), otită medie cu septicopiemie și localizări articulare (la 28 ani), hepatită epidemică în 1950 și 1974, colecistită cronică, apendicită acută operată. Din examenul obiectiv este de reținut constatarea unui subicter steral edeme ale membrelor inferioare, palparea unui ficat de consistență mai fermă cu un lat de palmă, ușor sensibil, și a unei spline crescută în volum și consistență, palpabilă de două-trei degete sub rebordul costal.

Din numeroasele examene paraclinice amintim că hematiile au fost la internare $1.760.000/\text{mm}^3$, Hb 33%, $L = 4.900/\text{mm}^3$, cu 48% limfocite, 8% monocite și 44% neutrofile, măduva hematogenă infiltrată cu elemente limforeticulare în proporție de 13%.

Probele care atestă sindromul de citoliză hepatică, sindromul hepatopriv și sindromul inflamator, sînt prezente. Disproteinemie se caracterizează printr-o creștere marcată a IgG și IgM.

În ultima vreme, în funcție de mecanismul patogenetic, sînt descrise două tipuri de aplazie eritroidă pură. Un tip evoluează cu concentrații mari de eritropoetină, care nu se deosebește chimic sau biologic de eritropoetina normală, și la care se găsește în sînge o concentrație crescută de IgG inhibitoare a eritropoezei. Al doilea tip, mult mai rar, se caracterizează prin concentrații foar-

te scăzute de eritropoetină în sânge sau chiar absența hormonului și prin prezența unei IgG care neutralizează eritropoetina. În unele aplazii medulare se suspectează o reacție autoimună celulară, din motivul infiltrării măduvei osoase cu limfocite (Peschle C, 1977).

În tipul I de aplazie s-a demonstrat că măduva osoasă umană incubată cu plasmă de la bolnavi cu aplazia eritroidă pură inhibă eritropoeza (Krantz 1975). Există dovezi că factorul inhibitor din plasmă este o imunoglobulină și că inhibiția este dependentă de complement (Thompson, 1977). Urina unor astfel de bolnavi constituie o bogată sursă de eritropoetină. Dealtfel, Miyake, Kung și Goldwasser, pornind de la o cantitate de 2550 l urină, provenită de la bolnavi cu anemie aplastică, au reușit, în 1977, să purifice hormonul. Hormonul purificat are 70.400 U/mg proteină.

Bolnavul examinat de noi se încadrează în primul tip de aplazie eritroidă pură și elimină cca 600 U eritropoetină/zi. În aproximativ patru luni, în urina bolnavului, s-ar fi eliminat 1 mg de eritropoetină pură. Prezența gamaglobulinelor în proporție de 28% și evidențierea, la imunelectroforeză, a unor concentrații mai mari de IgG și IgM ne atrage atenția asupra unui mecanism autoimun umoral. Infiltratul limforecticular al măduvei osoase (13% elemente limforecticulare) pune problema unui eventual mecanism autoimun celular.

Al doilea tip de aplazie eritroidă pură a fost produs experimental prin injectarea la șoareci, timp de patru zile consecutiv, a unui ser imun antieritropoetină. La o zi după injectarea serului imun, celulele eritroide din primul stadiu dispar din măduva osoasă, iar după șase zile, nu se mai găsesc celule nucleate eritroide. Injectarea în continuare a anticorpilor rămâne fără răspuns, din motivul că se formează anticorpi față de serul imun antieritropoetină (Schoolley J. C., 1977). Serul unor asemenea bolnavi conține IgG care neutralizează eritropoetina (Peschle, 1977).

O parte dintre cazurile de aplazie eritroidă pură sînt asociate cu timomul benign, tiroidita Hashimoto, carcinoame, limfoame, lupus eritematos (Thompson, 1977). Nici una din aceste afecțiuni n-au fost depistate la acest bolnav.

Tratamentul preconizat în aplazia eritroidă pură este cu medicamente imunosupresive (Thompson, 1957, Peschle, 1977) și în anemia aplastică cu steroizi androgeni anabolizanți (Thompson, 1977).

Creșterea eritropoetinei se mai întâlnește în toate cazurile de hipoxemii (boli cardiace dobîndite și congenitale, boli pulmonare,

hemoglobinopatii; excepție face emfizemul pulmonar, în care, grație unui mecanism neelucidat creșterea nu se produce).

Comportarea eritropoetinei serice în cordul pulmonar cronic a fost studiată în ultimii ani la Facultatea din Cluj (Olinic, Dorofteiu, 1972), dat fiind caracterul avansat al hipoxiei și eritrocitoza exprimată în această boală, iar la bolnavi pulmonari cu eritrocitoză exprimată, de Alexanian și colab. (1967, 1970). Datorită hematocritului crescut, valorile eritropoetinei nu sînt însă prea mari. Concentrația eritropoetinei serice și urinare este în raport cu valoarea hipoxiei și, în urma ameliorării bolii primare, ea scade proporțional cu reducerea consecutivă a eritrocitozei.

Creșteri neadaptative (inadecvate) ale eritropoetinei se întîlnesc în boli renale (chiste, hidronefroză, tumori maligne, stenoza arterei renale), în boli endocrine (hiperplazii și tumori suprarenale, hipersecreție sau tratament cu androgeni), în unele neoplasme (hemangioblastom cerebelos, hepatom și fibrom uterin).

Ar fi de așteptat ca unul sau mai multe mecanisme comune ale biogenezei eritropoetinei să se întîlnească în toate aceste boli. Hiperproducția eritropoetinei în afecțiunile renale poate fi foarte bine conectată cu rolul rinichiului și formarea eritrogeninei (Gordon, 1968). Alexanian (1977) apreciază că nu este încă evident dacă producerea hormonului se face de către chist sau țesutul tumoral renal sau dacă acestea, comprimînd parenchimul indemn, produc hipoxierea sa prin reducerea fluxului sanguin, ceea ce are ca urmare producerea de eritropoetină. Poliglobuliile produse de creșteri neadaptative (inadecvate) ale eritropoetinei pot fi evidențiate prin testarea hormonului din ser sau urină. Hormonii suprarenali, adrenalina, ar putea interveni prin intermediul receptorilor beta-adrenergici (Baciu și colab., 1969; Fisher 1973, 1974, 1977), iar ACTH, prin efect specific (Halvorsen, 1963).

În sfîrșit, participarea unor tumori la activarea eritropoezei ar putea fi corelată cu mecanismul extrarenal de producere și anume cu rolul aparatului lizozomal al SRE din țesutul proliferat, fapt sugerat de unele date ale noastre (Baciu, Dorofteiu și colab., 1973, Baciu, Ivanof și colab., 1978).

SCĂDEREA ERITROPOETINEI SERICE

Scăderea nivelului eritropoetinei serice se întîlnește la subiecții, care, după ce s-au adaptat la altitudini mari ~ 5000 m, revin la nivelul mării. După 12 ore (Faura și colab., 1969), concentrația hormonului devine nedetectabilă.

În insuficiența renală gravă, scăderea este explicată prin reducerea participării rinichiului la biogeneza sa (A d a m s o n și colab., 1968). Rinichiul transplantat preia secreția în oarecare măsură. Dacă se produce rejecția transplantului are loc o creștere exprimată a eritropoetinei serice, consecință a autolizei parenchimului renal (A b b r e c h t și colab., 1968, D a n i e l l o 1971).

La două treimi din bolnavii cu artrită reumatismală, infecții cronice (W a r d și colab., 1971), scade eritropoetina, restul de 1/3 prezentând ușoare creșteri. În competiția hipoxie-reacție imunitară, organismul reacționează punând în joc mecanismele imunitare pe prim plan, reactive, cu atenuarea răspunsului eritropoetic, așa cum a arătat E. R o s e n f e l d (1967). Creșterea neuraminidazei în plasmă constituie un factor blocant al eritropoetinei *in vivo*.

ERITROPOETINA ÎN TERAPIE

S-au încercat pînă acum experimental sau în clinică pe voluntari efectele terapeutice ale eritropoetinei, administrată sub formă de plasmă omoloagă, bogată în hormon, sau sub formă de extrase din urina umană sau din ser de oaie.

În anemia renală, deși răspunsul animalelor la eritropoetină este mai redus, probabil din cauza efectului produșilor toxici de retenție, se produce totuși creșterea însemnată a eritropoezei. La om, administrarea concentratelor urinare, producînd la locul de injectare reacții inflamatorii și chiar febră, creșterea reticulocitelor și eritrocitelor, este însoțită de leucocitoză și trombocitoză. Efecte evidente se produc, la subiecții umani de control, după administrarea între 500 și 1940 unități (V a n D y k e, 1967; L a r s e n și colab., 1963). La un bolnav cu glomerulo-nefrită cronică, V a n D y k e (1967) nu obține efect la administrarea 12.544 U eritropoetină umană timp de trei zile, ceea ce demonstrează reducerea sensibilității măduvei osoase la hormonul eritropoetic.

Încercările de pînă acum au mai mult un caracter orientativ și comportă dificultăți, întrucît obținerea de eritropoetină urinară purificată, în cantități necesare pentru terapie, nu este încă rezolvată.

Policitemia vera, caracterizată prin creșterea în exces a producerii de eritrocite, precum și a granulocitelor și plăcuțelor cu hiperplazie medulară și uneori splenomegalii, reprezintă, după cum se pare, o îmbolnăvire cu multiple mecanisme patogenetice. Cei mai mulți bolnavi, cu toată poliglobulia marcată, au o concentrație de

eritropoetină redusă sau chiar nedetectabilă, când eritrocitoza e deosebit de mare.

Titrul redus al eritropoetinei, față de cantitatea apreciabilă de hemoglobină și numărul ridicat al hematiilor în policitemii face dificil diagnosticul între eritrocitoze și policitemii cu reglarea inadecvată a eritropoezei. După flebotomii, în eritrocitoze, scăderea valorii eritrocitare determină creșterea eritropoetinei în mod asemănător cu cea întâlnită la subiecții normali, pe când în policitemiile neadaptative, valorile eritropoetinei, inițial mărite, rămân mereu superioare.

S-a emis încă ipoteza că bolnavii din această grupă ar avea probabil o populație de celule roșii medulare sensibile la eritropoetină și una insensibilă, care nu răspunde la eritropoetină, proliferând activ.

Baciu și colab. (1963) au studiat, la bolnavi cu poliglobulie primară, difuziunea oxigenului prin pereții vaselor capilare spre sistemul nervos central, organul cel mai sensibil la hipoxie, care constituie un stimul central al eritropoezei (Baciu și colab., 1960, 1965). În acest scop au imaginat aplicarea la om a unui test de rezistență la hipoxie, în care subiectul respiră într-un sistem închis format dintr-o piesă bucală cu supape respiratoare, un spirometru, conținând 4 l aer atmosferic, și un rezervor de calciu sodat pentru fixarea vaporilor de apă și a CO_2 . În timpul probei, oxigenul scade progresiv, în timp ce CO_2 este fixat pe măsură ce se formează. Se realizează astfel, la subiectul în studiu, o hipoxie progresivă, în timpul căreia se înscrie EEG, ECG, oxigrama arteriolară și ritmul respirator. Testarea se întrerupe când pe traseul EEG apar unde lente teta și delta. Se notează la sfârșit: durata rezistenței, procentul de oxigenare a sîngelui arterial și procentul O_2 din spirometru.

Examinări repetate la 5 bolnavi cu poliglobulie esențială arată că la trei durata probei de rezistență este sub trei minute, în timp ce ceilalți doi bolnavi și martori rezistă între 3 și 5 minute; undele lente apar la bolnavi la o saturare de 80% în oxigen a sîngelui arterial și o concentrație a O_2 din aerul respirat de 7—9%, în timp ce martorii rezistă la o scădere a O_2 pînă la 64% în sîngele arterial și sub 5% în aerul respirator. Testarea se întrerupe când pe traseul EEG apar undele lente datorate tulburărilor de difuziune a O_2 din sînge spre receptorii specializați, în primul rînd situați în s.n.c.

Interesante, sub raport teoretic și cu valoare aplicativă, diagnostică, sînt rezultatele dozării de eritropoetină în patologia mater-

no-infantilă (Halvorsen și Finne, 1963). Eritropoetina începe să se formeze la fătul uman în a 32-a săptămână de gestație, când apare mecanismul eritroreglator. Bolile hemolitice ale fătului, cu scăderea Hb sub 10—11%, măresc titrul eritropoetinei atât în sângele cordonului ombilical, cât și în lichidul amniotic, iar în limitele acestei scăderi, numai în sângele cordonului. Titrul eritropoetinei materne nu este influențat.



REGLAREA NERVOASĂ A ERITROPOEZEI

Lucrările lui Viault (1890), P. Bert (1882), Miescher (1897) Călugăreanu și Henry (1901) au semnalat că aerul rarefiat de altitudine produce cu regularitate creșterea numărului eritrocitelor circulante. Pe cale pur logică, Miescher (1897) a formulat teoria stimulării directe a insulelor eritropoetice medulare prin hipoxie. Abia în anul 1948, Rosin și Rachmilewitz și, puțin mai târziu Magnusen (1949) au demonstrat *in vitro* că scăderea tensiunii oxigenului sub limite fiziologice inhibă proliferarea seriei roșii medulare. A fost infirmată astfel teoria, acceptată timp de 50 ani, a stimulării directe a eritropoezei prin hipoxie.

Cantacuzino (1900) explică mecanismul stimulării eritropoezei prin produși de hemoliză, studiați mai târziu de Ujanski (1959), Hirsjärvi (1959), Brown și colab. (1963).

O a treia explicație a modului de reglare a producerii de eritrocite se fundamentează pe bine cunoscutele experiențe ale lui Carnot și Deflandre (1906). Serul iepurilor, cărora li s-a provocat înainte o hemoragie importantă, injectat în cantități mari la iepuri normali, le provoacă poliglobulie. Efectul s-ar datora unor substanțe ipotetice, hemopoetinele, care apar în serul anemic. Existența unei reglări umorale a eritropoezei, prin factorul specific de reglare denumit eritropoetină, a fost demonstrată indubitabil de Reissman (1950).

În sfârșit, o altă serie de cercetări experimentale și clinice aduc argumente certe pentru o reglare nervos centrală a eritropoezei (Schulhof și Mathies, 1927; Guillain și Lechelle 1931; Heilmeyer 1933; Riccitelli 1933; Hoff 1933; Beer și Böhm 1939; Wespi din școala lui Hess, 1944; Seip 1953).

Posibilitatea influențării funcției măduvei osoase prin intermediul sistemului nervos a fost demonstrată și pentru seria leuco-

citară (Papilian și Jianu 1927; Hoff 1928; Rosenow 1931; Benetato, Baci, Vlad, 1945).

Secționarea măduvei spinării în regiunea cervicală diminuează răspunsul eritocitar la hipoxie (Heilmeyer 1933; Hayashida 1936 și Sugura 1938, cit. Komiya 1956), ceea ce se poate explica prin întreruperea legăturii între centri nervoși vegetativi superiori și organele efectoare.

Hipoxia tisulară, stimulul fiziologic specific al eritropoezei, acționează fie direct central asupra unor anumite grupe neuronale, pe cale direct centrală (Ruhensroth-Bauer, 1950; Komiya 1956), fie indirect prin intermediul receptorilor zonei sino-carotidiene și cardioaortice (Latner, 1937, 1938; Cernigowski și Iarosevski, 1953).

Calea eferentă, vegetativă, ar fi cea simpatică (Beer, 1942; Ruhensroth-Bauer 1950; Komiya, 1956; Takaku și colab., 1962).

Predilecția cercetătorilor, în epoca din jurul anului 1950, pentru studiul mecanismului umoral de reglare, se datorește metodologiei mai accesibile și descrierii de către Stohlman și colab. (1954) a unui caz de poliglobulie, la care participarea mecanismului nervos apărea exclusă. S-a consolidat astfel concepția că poliglobulia produsă de hipoxie se datorează unui mecanism umoral. S-au elaborat, în această epocă (1953—1960), procedee de extragere și testare a eritropoetinei.

Următor anului 1960, combinând tehnicile cantitative ale hematologiei moderne cu cele de neurofiziologie, s-au adus contribuții la mecanismul nervos de reglare a eritropoezei.

REGLAREA NERVOS-CENTRALĂ

Cercetări experimentale privind efectul direct al hipoxiei asupra măduvei hematopoetice *in vivo* și asupra măsurii în care scăderea tensiunii oxigenului în sânge, ca urmare a hipoxiei, pun în activitate centri nervoși cu rol în reglarea eritropoezei prin afe-rențele pornite de la receptorii organelor periferice (Baci, Neumann, Dorofteiu, Pitea, 1957). Studiind efectul hipoxiei la animalele tratate cu substanțe farmacodinamice, s-a studiat, la fel, localizarea centrilor nervoși cu rol în reglarea eritropoezei.

Experiențele s-au făcut pe șobolani albi. Expunerea animalelor de experiență, timp de 72 ore, la o tensiune de oxigen corespun-zătoare altitudinii de 5000 m, determină creșterea numărului hema-

tiilor în sângele circulant, în medie cu $1.379.473/\text{mm}^3$ și a reticulocitelor cu $11,43\%$.

Pentru a răspunde la întrebarea dacă excitarea centrilor nervoși, cu rol în reglarea hematopoezei, se face sub acțiunea stimulilor veniți de la receptorii organelor periferice în hipoxie, s-a plasat pe cîrja aortei, imediat după emergența arterei subclaviculare stîngi, un inel de argint, prin care se micșorează lumenul aortei la 20—25%, producîndu-se astfel, prin dirijarea sîngelui spre extremitatea cefalică, ischemierea restului corpului, uneori atît de exprimată încît apăreau tulburări trofice.

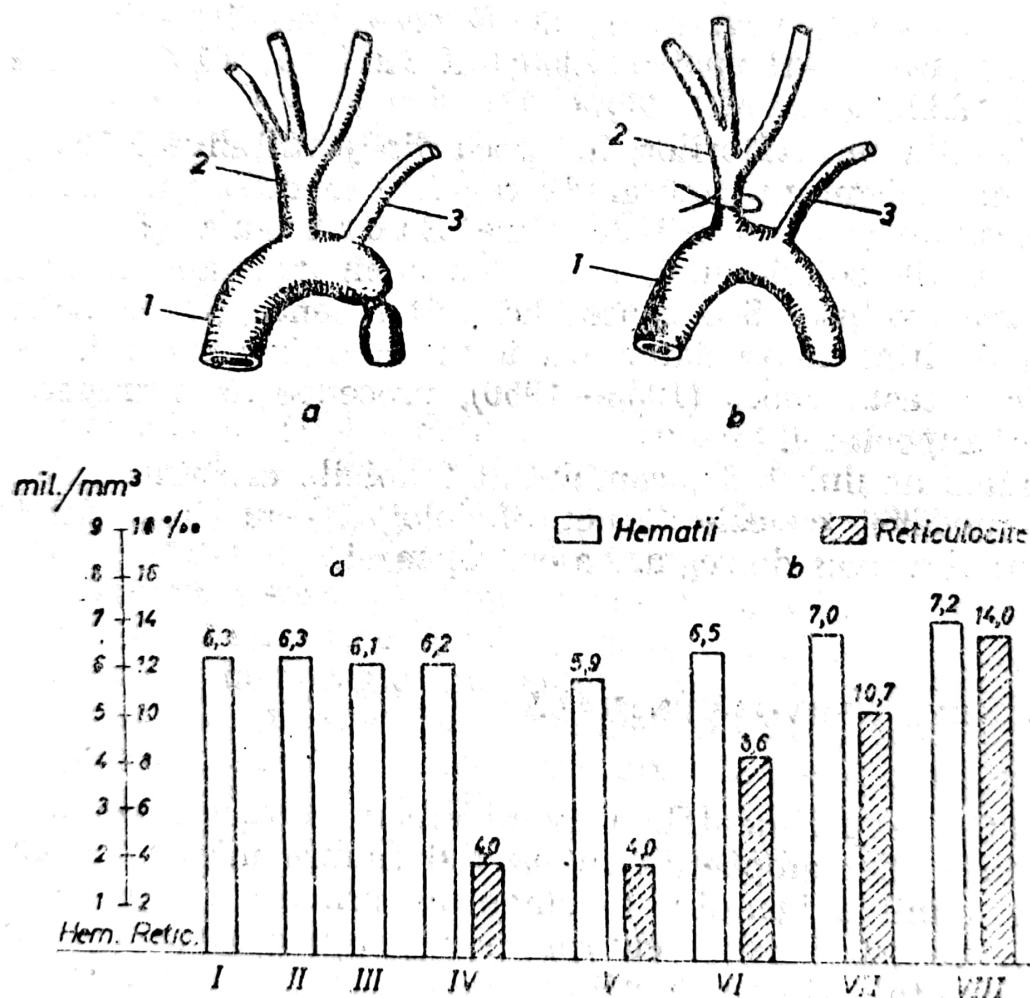


Fig. 45. Sus: Schema modului de ischemiere a trunchiului prin plasarea unui inel de argint pe cîrja aortei (a) și de ischemiere a extremității cefalice prin ligatura arterei anonime (trunchiul brachiocefalic) în torace (b): 1 — cîrja aortei; 2 — artera anonimă; 3 — artera subclaviculă stîngă. Jos: Efectul hipoxiei ischemice periferice (a) și centrale (b) asupra eritropoezei la șobolani: I — înainte; II — după 4 zile; III — după 7 zile; IV — după 11 zile; V — înainte; VI — după 4 zile; VII — după 7 zile, VIII — după 10 zile.

Inelul era plasat sub anestezie cu Evipan sodic (4—6 mg/100 g i.v.), respirația fiind întreținută prin administrarea de oxigen prin sondă traheală, după Porter și Small (1947).

În ziua operației și apoi la intervale de 4—5 zile, timp de 26 de zile, s-au determinat hematiile și reticulocitele. După cum reiese din fig. 45, anoxia periferică în teritoriul aortei descendente, asociată cu mărirea irigației centrale, nu determină apariția reacției eritrocitare.

Alți șobolani au fost supuși unei intervenții asemănătoare pe torace, de astă dată ligaturându-se trunchiul arterial brahiocefalic drept. În acest fel, irigația regiunii gâtului și a capului se face numai prin artera vertebrală stângă. Ca urmare se produce ischemierea exclusivă a extremității cefalice, irigația sanguină în restul organismului nefiind compromisă.

După cum rezultă din figura 45 și tabelul XI, ischemia urmată de hipoxia extremității cefalice determină, după patru zile, o reacție eritocitară cu creșterea medie a hematiilor cu 504.000/mm³, iar după 7 zile cu 1.034.000/mm³. Reticulocitele cresc cu 4,6‰, după patru zile, și cu 6,7‰, după șapte zile.

Urmărirea comportamentului aparatului eritropoetic s-a făcut prin studiul histologic al măduvei osoase din vertebre și din epifiza femurală. Oasele au fost fixate, decalcificate și apoi incluse în para-

T ABELUL X

VALORILE MEDII ALE HEMATIILOR ȘI RETICULOCITELOR ÎNAINTE ȘI DUPĂ EXPUNERE LA HIPOBARISM

Lot nr.	Nr. animale	Intervenția	Înainte		După 72 ore		Diferențe	
			Hematii pe mm ³	Reticulocite ‰	Hematii pe mm ³	Reticulocite ‰	Hematii pe mm ³	Reticulocite ‰
1	19	Martori	6412105 ±119000	4,28	7791578 ±126000	15,71	+1379473 p<0.01	+11,43
2	9	Măduva spinării	5842222 ±134000	4,00	5892222 ±143000	5,00	+ 50000 p>0.5	+1
3	10	Tratate cu luminal Na	6292000 ±153000	2,90	6254000 ±150000	2,90	- 38000 p>0.5	-
4	8	Tratate cu largactil	6865000 ± 19200	5,33	6621250 ±179000	5,00	-243750 p>0.5	-0,33

fină. Secțiuni de 6—8 μ au fost colorate cu hematoxilină eozină, metoda Van Gieson și metoda Mann-Dominici.

Mielograma, reprodusă în tabelul XII, arată, la animalele supuse acțiunii hipobarismului, o activare a eritropoezei, ducând la creșterea procentuală a elementelor mai tinere din seria roșie (proeritroblaști, macroblaști).

La animalele cu măduva spinării secționată, mielograma din vertebrele sub- și suprajacente secțiunii nu arată deosebiri semnificative, ceea ce infirmă efectul nervos direct și argumentează pentru elaborarea prin sistemul nervos al unui factor umoral.

Lipsa reacției eritrocitare la animale cu măduva spinării secționată supuse hipoxiei demonstrează atât necesitatea participării etapelor superioare ale sistemului nervos, cât și necesitatea integrității căilor medulare în desfășurarea acestei reacții. Se pune întrebarea dacă în măduva spinării se găsesc numai căile eferente ale reflexului, cum a arătat Beer (1939, 1942), sau căi aferente, prin care se realizează stimularea reflexă centrală. Experiențele în care s-a realizat ocluzia parțială a cîrjii aortice, provocînd astfel hipoxia viscerelor toraco-abdominale și a celei mai mari părți a măduvei hematogene, neurmată de poliglobulie, constituie o dovadă că stimularea centrală nu se face reflex, prin receptorii și aferențele meduloviscerale. Cu o tehnică diferită, P. G. Linke (1955), în urma excitării capătului periferic al marelui splanchnic, obține, la iepuri, creșterea reticulocitelor și apariția normoblaștilor în sângele periferic, pe cînd excitarea capătului central rămîne fără efect asupra seriei roșii sanguine. Apariția poliglobuliei la animalele din lo-

TABELUL XII

MIELOGRAMA SERIEI ROȘII ÎN MĂDUVA VERTEBRALĂ ȘI EPIFIZA FEMURALĂ (RAPORTAT LA 100 ELEMENTE ALBE). MEDII PE LOTURI DE CÎTE PATRU ANIMALE

I. Animale neexpuse la hipobarism			
Proeritroblaști	3	Proeritroblaști	2,8
Macroblaști	10	Macroblaști	11
Normoblaști	18	Normoblaști	16,5
II. Animale expuse la hipobarism		b) Sub secțiune măduvei a	
A. Martorii (Lotul I)		Proeritroblaști	3,2
Proeritroblaști	5,5	Macroblaști	9
Macroblaști	16	Normoblaști	17
Normoblaști	23	C. Tratate cu luminal sodic	
B. Cu măduva cervicală secționată		Proeritroblaști	1,9
a) Deasupra secțiunii măduvei		Macroblaști	5
		Normoblaști	12,7

tul cu trunchiul brahiocefalic ligaturat, la care irigarea extremității cefalice se face exclusiv prin artera vertebrală stîngă, aduce în primul rînd confirmarea valorii metodei utilizate de noi pentru a obține hipoxia regională. Apariția poliglobuliei în urma ischemierii și hipoxiei extremității cefalice ar putea fi explicată, fie prin excitarea direct centrală prin hipoxie, fie prin excitarea zonelor reflexogene sino-carotidiene, fie, în sfîrșit, umoral, prin hipofiză sau tiroidă la fel ischemiate. Dacă poliglobulia s-ar realiza prin hipofiză ar trebui ca ea să apară la animalele cu măduva spinării secționată, aferențele medulare neavînd — așa cum s-a arătat — nici un rol în declanșarea poliglobuliei. În ce privește tiroida, neparticiparea ei în producerea poliglobuliei de altitudine a fost demonstrată în cercetări experimentale de către Wang și Verzar (1949), care au arătat că animalele tiroidectomizate, supuse la o presiune atmosferică scăzută, prezintă, după cîteva luni de la operație, creșterea hematiilor și hemoglobinei circulante.

Ar mai rămîne două posibilități de acțiune centrală a hipoxiei: reflexă, prin receptorii sino-carotidieni, și directă, asupra centrilor nervoși.

În scopul precizării rolului zonei chemoceptive sino-carotidiene în reglarea eritropoezei, B a c i u și colab. (1961) au efectuat cercetări experimentale pe cîini, utilizînd o variantă a „capului izolat”.

Tehnica „capului izolat” a lui H e y m a n s (1929, 1939), așa cum se știe, întrerupe legăturile nervoase din măduva spinării între cap și trunchi, menținînd ca unică conexiune cele două trunchiuri vago-simpatice. În acest mod, întrerupînd majoritatea căilor aferente și eferente cerebro-somatice și viscerale limitează posibilitățile studiului proceselor de reglare central-nervoasă a funcțiilor somatice și viscerale.

Pentru aceste motive, ca urmare a numeroase încercări începute în anul 1942, B e n e t a t o, O p r i ș i u, B a c i u (1946, 1947) au elaborat o tehnică a „capului izolat” mai perfecționată, în care se păstrează integră, sub raport anatomic și funcțional, și măduva spinării, asigurîndu-se totodată o izolare umorală cît mai bună între cap și trunchi. Cu aceste perfecționări tehnica a fost denumită de izolare umorală somato-cefalică. Ea a fost descrisă în 1946 și 1947, iar completările aduse la tehnica inițială după 1947, au fost descrise sumar în 1951.

Procedeuul „capului izolat” se face pe doi cîini anesteziați cu cloraloză (0,08—0,1 g/l kg animal), dintre care unul este animal

transfuzor sau donator de sînge (notat în fig. 46 cu A), iar celălalt receptor sau primitor cu „capul izolat” (notat cu B). Capul animalului receptor este separat de trunchi în dreptul celei de a doua vertebre cervicale prin secționarea tuturor elementelor anatomice din regiunea gîtului, cu excepția arterelor carotide, a venelor jugulare externe, a trunchiurilor vago-simpatice și a coloanei vertebrale. Pentru a înlătura orice comunicare vasculară între capul și trunchiul animalului, se procedează în felul următor (fig. 47): se rad insertiile cu periost cu tot, de pe apofizele spinoase (1) și transverse (2), precum și de pe lamele și corpul vertebrei (3) a doua cervicală, distrugîndu-se toate rețelele și plexurile venoase extrarahidiene. Apoi, cu o freză dentară — de preferință cu o freză globu-

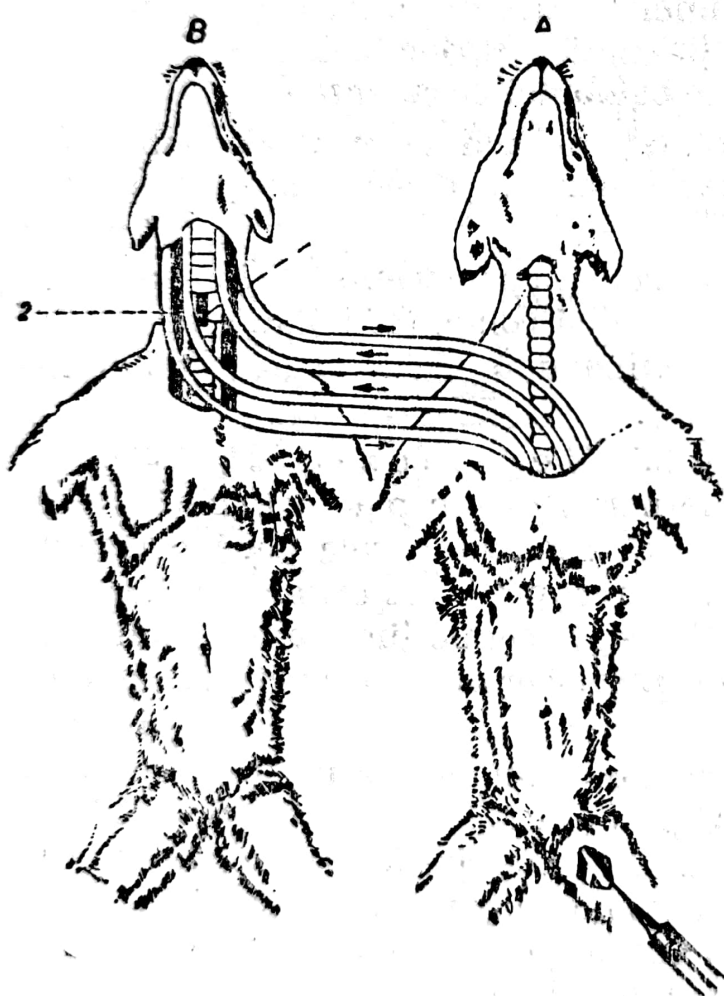


Fig. 46. Reprezentarea schematică a tehnicii „capului izolat”: A. animal transfuzor. B. animal receptor cu capul izolat și legat de trunchi numai prin măduva spinării (1) și nervii vagi (2).

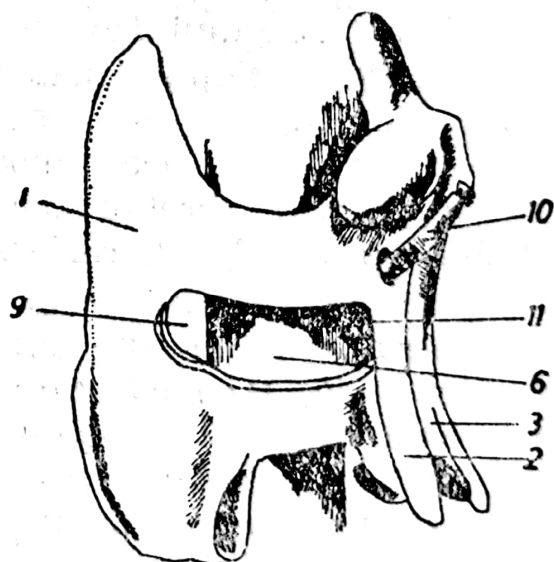


Fig. 47. Aspectul schematic al preparatului după ferestruirea canalului rahidian. 1 — apofiza spinoasă; 2 — apofiza transversă; 3 — corpul vertebrei a II-a cervicale; 6 — măduva spinării; 9 — fereastra din lama vertebrală; 10 — artera vertebrală.

lară — se perforează apofiza spinoasă, la baza sa, de o parte și de cealaltă a vertebrei, lărgind orificiul de-a lungul bazei apofizei spinose pe o distanță de 5—6 mm (9). De la capetele acestei perforații se efectuează câte două șanțuri verticale prin lamele vertebrale, pînă la apofizele transverse, de o parte și de cealaltă a corpului vertebral, apar orificiile prin care trec arterele vertebrale (10). Acestea se secționează între două legături. Se adîncesc apoi cele două șanțuri pînă la măduva spinării, de o parte și de cealaltă a vertebrei și ridicînd câte o lamă osoasă, se deschid în canalul rahidian, de o parte și de cealaltă (9), câte o fereastră de 5—6 mm lungime și de 7—8 mm lățime, prin care apare măduva înconjurată de dura mater (6). În partea inferioară a ferestrei, pe un plan ventral față de măduvă, se află sinusul venos al coloanei vertebrale (notat cu cifra 11 în fig. 47), situat pe grosimea periostului.

Ligatura sinusului venos constituie un moment foarte important al intervenției. Ea se face în felul următor: evitînd întrebuințarea instrumentelor ascuțite, pentru a nu perfora sinusul venos, se pătrunde cu o freză dentară dorso-ventral perforîndu-se corpul vertebral de o parte și de cealaltă a sinusului venos (în dreptul locului notat cu 4, în fig. 48). Perforarea corpului vertebral se execută protejînd sinusul venos cu o spatulă fină. Apoi, cu ajutorul unui încărcător, se introduce un fir de mătase gros (notat cu cifra 5 în fig. 48) între dura mater și sinusul venos și, scoțînd extremitățile firului prin orificiul din corpul vertebral, se leagă strîns sinusul.

Legarea vaselor vertebrale, precum și a celor extra- și intrarahidiene, cu intercalarea „capului izolat” în circulația carotido-jugulară a animalului transfuzor, nu asigură izolarea umorală completă a „capului izolat” de trunchiul său. Unii coloranți, cum este indigo-carminul, mediatorii chimici, ca acetilcolina, și hormonii (adrenalina și pituitrina), administrați în trunchi, trec în „capul izolat”.

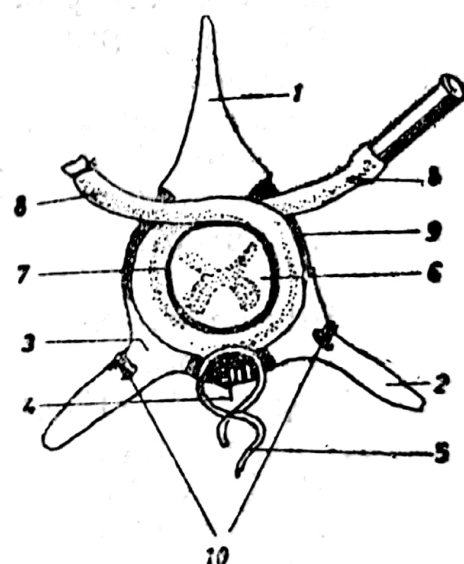


Fig. 48. Aspectul pe secțiune transversală la nivelul celei de a doua vertebre cervicale a coloanei vertebrale. Se vede legătura (5) așezată pe sinusul venos (4) și manșeta aplicată în jurul măduvei (8). 1 — apofiza spinoasă; 2 — apofiza transversă; 3 — corpul vertebral; 4 — sinusul venos; 5 — ața; 6 — măduva spinării; 7 — meningele; 8 — manșeta pneumatică; 9 — ferestrele în lamele vertebrale; 10 — arterele vertebrale.

Comunicarea umorală între „capul izolat” și trunchiul său prin arterele spinale anterioare, provenite la cîini din ramurile cerebro-spinale ale arterei carotide și avînd anastomoze cu ramurile laterale spinale ale arterei vertebrale, provenite din porțiunea situată dedesubtul ligaturii, adică mai jos de vertebra a doua cervicală, este foarte importantă. De aceea se secționează pe linia mediană a feței anterioare a măduvei, în sens longitudinal, dura mater și apoi, în interiorul său, cu grija de a nu leza măduva spinării, se practică ligatura arterelor spinale anterioare. Pentru experiențe de mai lungă durată, pentru oprirea comunicării prin lichidul cefalorahidian se poate plasa în jurul măduvei o manșetă pneumatică (fig. 48, 8).

După terminarea izolării, „capul izolat” al receptorului se intercalează în circulația carotido-jugulară a animalului transfuzor, în așa fel încît extremitățile cardiace ale carotidelor și ale jugularelor animalului transfuzor să se anastomozeze, prin intermediul canulelor lui Payr, cu capetele cefalice ale carotidelor și ale jugularelor animalului receptor, avînd grijă să evităm întreruperea totală a circulației în „capul izolat” sau exanguinarea unui animal în favoarea celui alt.

Prin acest procedeu, capul receptorului rămîne izolat de orice legătură vasculară și umorală cu trunchiul, fiind legat de acesta exclusiv prin măduva spinării și cei doi nervi vagi și menținut în viață prin circulația carotido-jugulară a animalului transfuzor (fig. 46).

Viabilitatea preparatului este de 2—8 ore, iar, în condiții fericite, de 10—16 ore.

Baciu și colab. (1960) au adaptat tehnica descrisă într-o variantă cronică, pentru realizarea unui model de hipoxie ischemică arterială cefalică. În acest scop, intervenția chirurgicală de separare cap-trunchi se practică aseptice în anestezie cu cloraloză (0,08 g/kg). Pe lîngă legăturile nervoase cap-trunchi (măduva spinării) se conservă continuitatea pielii, după izolarea de țesuturile subjacente în regiunea antero-laterală a gîtului, cu scopul de a prepara două lambouri cutanate pentru tunelizarea arterelor carotide comune, care, astfel conservate, rămîn unica cale de aport a sîngelui oxigenat spre extremitatea cefalică. Se mai păstrează intacte venele jugulare externe pentru circulația de întoarcere a capului, traheea și esofagul. În final, se reface continuitatea pielii gîtului, în zona în care s-a realizat separarea cap-trunchi.

După vindecare, cîinele astfel preparat constituie un excelent model la care, prin compresiunea pneumatică, măsurată manometric, a arterelor carotide comune, se poate realiza hipoxia ischemică

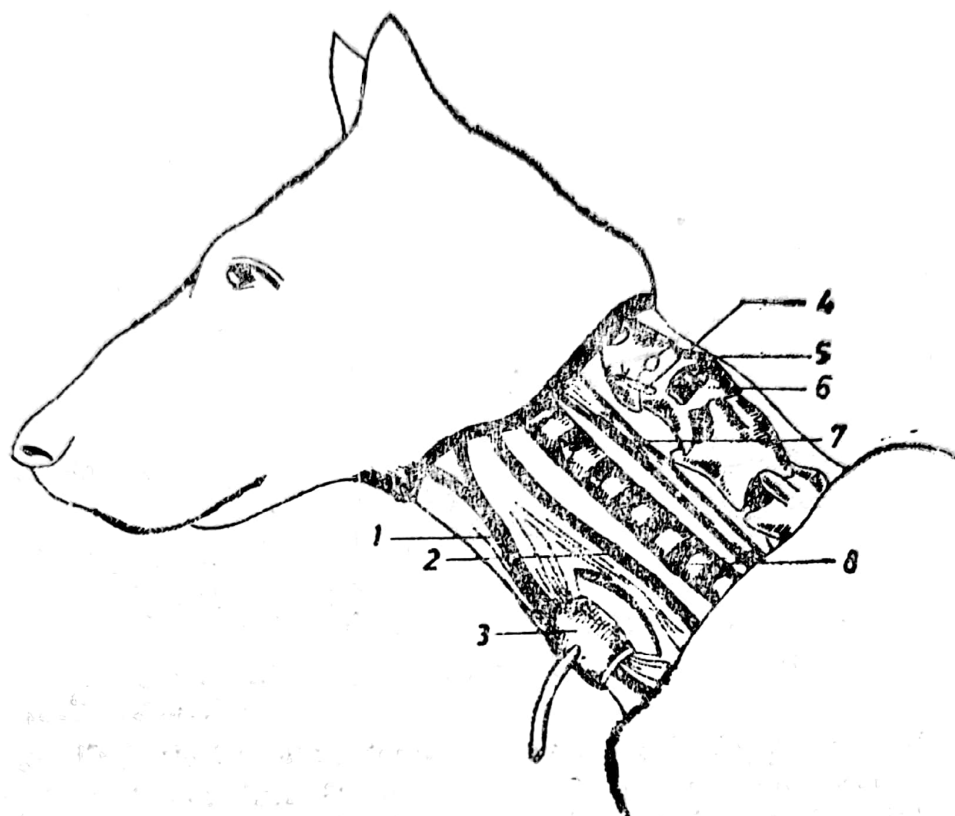


Fig. 49. Reprezentarea schematică a separării cronice a circulației somatocefalice la câine. 1 — artera carotidă comună; 2 — vena jugulară externă; 3 — sistem pneumatic pentru compresiunea arterelor carotide; 4 — artera vertebrală ligaturată; 5 — a doua vertebră cervicală perforată pentru a ligatura artera spinală; 6 — vasele peridurale; 7 — esofagul; 8 — traheea.

arterială cefalică, de intensitatea vizată. Proba unei izolări cvasitotale se execută prin compresiune manuală totală a ambelor carotide, ceea ce produce cu regularitate, după 5—10 s, pierderea stării de cunoștință.

Măsurările efectuate în aceste condiții: presiunea arterială (cu un traductor Statham), debitul circulator hipotalamic (sondă Gollenhoffen) și P_{O_2} tisular, în regiunea hipotalamică (electrod tip Clark), ultimii doi sensori fiind plasați bilateral în hipotalamus (Baciu, 1977), au permis evaluarea acestor parametrii în hipoxia ischemică arterială cefalică.

Presiunea parțială a O_2 , înregistrată amperometric cu electrod de platină introdus în hipotalamus, simultan cu înscrierea debitului hipotalamic de partea opusă, cu sonda Gollenhoffen, și a presiunii arteriale sistemice, arată că reducerea experimentală a debitului circulator hipotalamic cu 40%, prin compresiunea măsurată a ambelor artere carotide la câinele cu izolare somato-cefalică, deter-

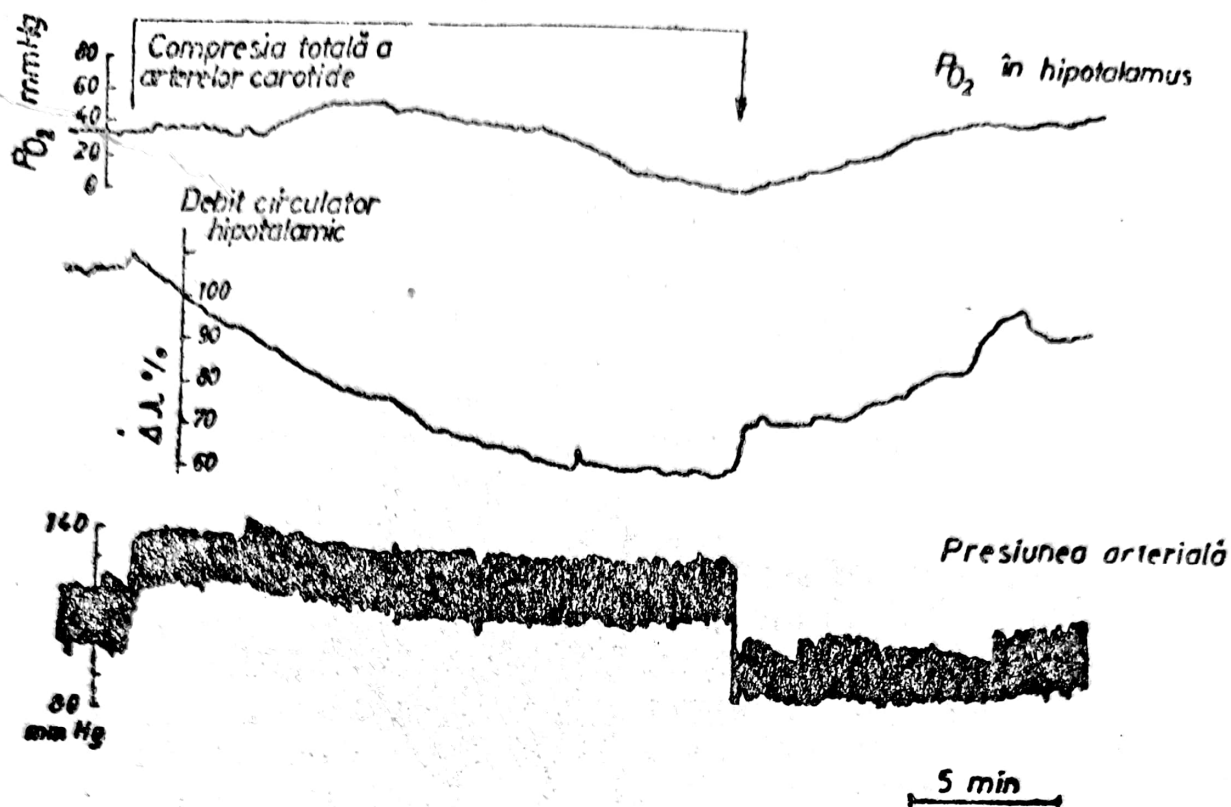


Fig. 50. Înregistrarea P_{O_2} în țesutul nervos hipotalamic (electrod Clark, tip canulă, a debitului circulator din hipotalamus (electrodă Gollenhoffen bazată pe principiul termoelementului încălzit), și a presiunii arteriale (traductor Statham) pe preparatul „cap izolat cronic”. După compresia parțială a carotidei comune (10 mmHg sub presiunea arterială sistolică), debitul circulator hipotalamic scade sub 50% iar P_{O_2} sub 10 mmHg. Este gradul de hipoxie care determină un răspuns eritrocitar pronunțat.

mină — ca urmare a hipoxiei ischemice arteriale — scăderea P_{O_2} tisular de la 32 mmHg la 50 mmHg, pentru ca P_{O_2} să scadă în continuare progresiv până la valori de 2—5 mmHg, la sfârșitul perioadei de hipoxie. Restabilirea circulației după 5 min este urmată de revenirea debitului hipotalamic și a P_{O_2} tisular, cu depășirea valorilor anterioare perioadei de ischemie (Baciu, 1957).

Pe lângă aceste modificări, hipoxia ischemică arterială cefalică mai determină neliniște motorie, polipnee, bradicardie, reflex de căscat precum și modificări caracteristice ale EEG: activare corticală pe fondul căreia apar unde lente caracteristice hipoxiei.

Înscrierea EEG s-a făcut cu electrozi aciformi implantați în craniu.

Experiențele au fost făcute pe două loturi de animale, al doilea diferind de primul prin denervarea zonei sino-carotidiene, care a fost efectuată chirurgical după procedeul lui Heymans (1933) și verificată prin instalarea hipertensiunii de defrenare. Zilnic, după 18 ore de inaniție, cu apă ad libitum, s-a determinat, din sângele circulant, numărul hematiilor și al reticulocitelor, hematocritul, he-

moglobina și diametrul mediu al hematiilor, calculându-se volumul globular mediu.

Concomitent s-a recoltat plasmă pentru determinarea eritropoetinei, care a fost izolată, cu fracțiunea II, prin precipitare cu metanol la rece, după procedeul descris de D u b e r t și colab. (1953).

Testarea eritropoetinei se făcea pe șobolani de 130—180 g, ținându-i la regimul obișnuit de pîine neagră și lapte, iar, înainte cu 18 ore de executarea determinărilor în inaniție, cu apă ad libitum. Pentru fiecare probă de ser se utilizează cel puțin trei șobolani. Se administrează intramuscular o cantitate de extras, care, exprimat în ser, reprezintă 20% din greutatea corporală a primitorului, în trei doze zilnice, egale. În prealabil se determină hematiile și se numără reticulocitele și, la fel, în a 4-a și a 5-a zi de la prima administrare, adică la 24 și 48 ore de la ultima injectare a materialului de testat.

Cantitatea de eritropoetină din plasma cîinilor cu hipoxie cerebrală a fost exprimată convențional prin creșterea reticulocitelor și hematiilor la șobolanii test.

Hipoxia extremității cefalice, în condițiile descrise, după 24 ore determină, la animalele primului lot, creșterea medie a hematiilor cu 0,9 mil/mm³ și a reticulocitelor cu 100%. Această creștere continuă progresiv pînă în ziua a 4-a, cînd atinge valori maxime. Hematiile ajung la 7,1 mil ± 0,3 de la valoarea inițială de 5,6 mil, iar reticulocitele la 10% ± 2 de la 3,2. Hematocritul și hemoglobina scad ușor, iar volumul globular mediu scade evident.

Eritropoetina plasmatică prezintă o creștere însemnată încă după primele ore de hipoxie, ajungînd la valori maxime după 24 ore, avînd apoi tendința la scădere (fig. 51).

Denervarea sinusurilor carotidiene executată la trei animale, din care două din lotul precedent, modifică evident reacția eritrocitară.

Polipneea lipsește. Eritropoetina crește mai puțin în primele 24 ore, continuînd să crească progresiv pînă a doua zi. Reticulocitele și hematiile nu se modifică în primele 2—3 zile, pentru a prezenta apoi în ziua a 4-a și a 5-a o creștere evidentă. Prin urmare, după denervarea sinusurilor carotidiene, reacția eritrocitară e mai tardivă, dar mai însemnată, așa cum reiese din fig. 52.

Rezultatele expuse aduc dovezi mai categorice că hipoxia extremității cefalice determină poliglobulie și că deficitul de oxigen nu acționează stimulator direct asupra măduvei osoase roșii.

Lucrările lui L a t n e r (1938), ale lui K a n și P o l i t a e v a (1956) în laboratorul lui C e r n i g o w s k i, au stabilit că dener-

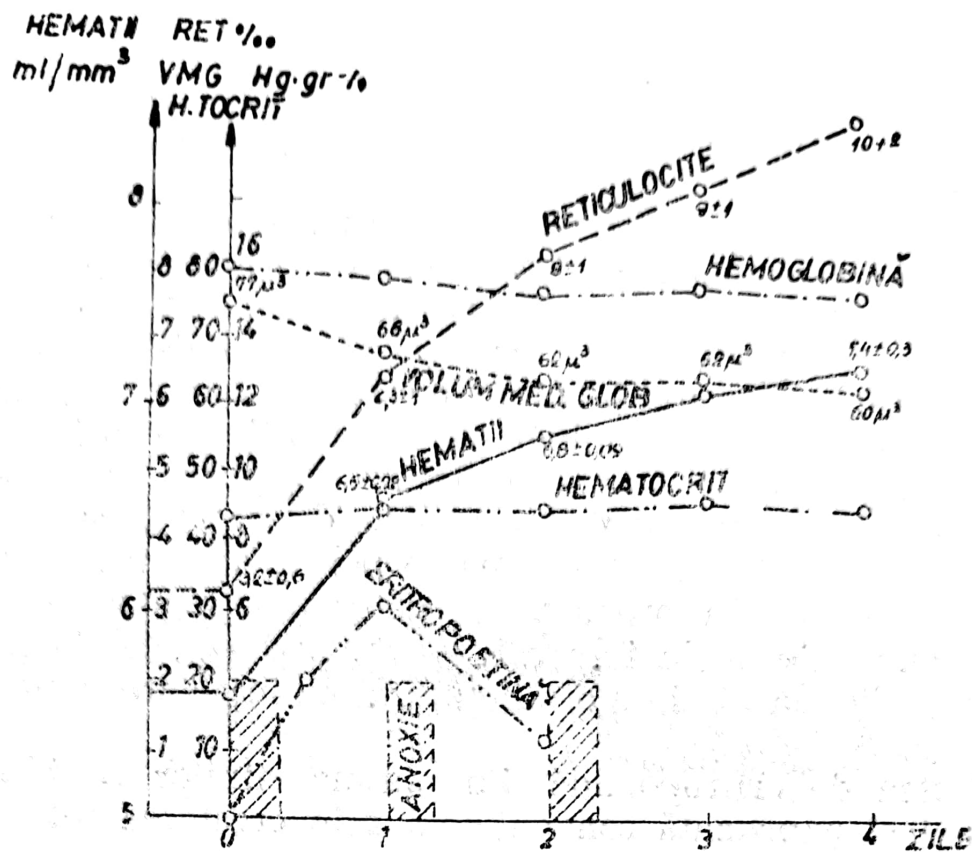


Fig. 51. Reacția eritrocitară provocată prin hipoxie cefalică, realizată timp de trei zile (8 ore zilnic), prin comprimarea arterelor carotide, la câini cu zonele reflexogene sino-carotidiene intacte (valori medii).

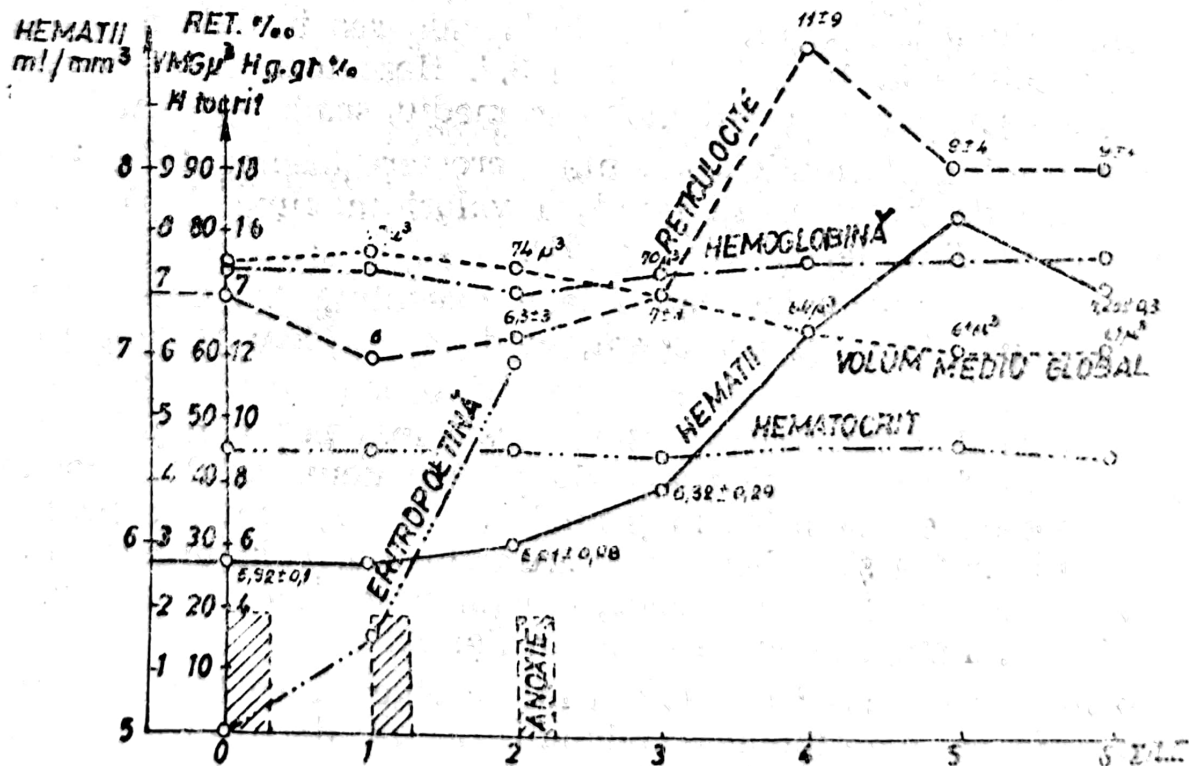


Fig. 52. Reacția eritrocitară provocată prin hipoxie cefalică realizată timp de trei zile (8 ore zilnic) prin comprimarea arterelor carotide, la câini cu zonele reflexogene sino-carotidiene denervate prin secționarea nervilor sinusali (valori medii).

varea zonelor sino-carotidiene și cardio-aortice provoacă la animalele de experiență apariția unei anemii, într-o primă fază prin intensificarea activității hemolitice cu hiperfuncție medulară, iar mai târziu, prin hipofuncția măduvei (inhibiția maturării eritroblaștilor și a citodiabazei). Interpretînd aceste rezultate, Cernigowski (1957) ajunge la concluzia că impulsurile fiziologice din zona sino-carotidiană și cardio-aortică au rol în reglarea eritropoezei, exercitînd efecte inhibitoare asupra activității hemolitice a splinei și asupra maturării seriei eritroblastice în măduva osoasă roșie.

Supunînd iepuri și pisici cu sinusurile carotidiene denervate, după o lună de la operație, la presiunea atmosferică de 287 mmHg (corespunzînd altitudinii de 7000 m), cîte trei ore zilnic, timp de 6 zile, Beller (cit. Cernigowski, 1957) a constatat că, pe cînd la martori, după a șasea expunere, hematiile creșteau în medie cu 1 milion iar hemoglobina cu 12%, cu creșterea eritroblaștilor în măduvă — la animalele cu sinusurile denervate, modificările nu depășeau deviațiile standard. Denervarea splinei în experiența lui Beller ducea la dispariția eritrocitozei la animalele supuse hipoxiei în aceleași condiții. Cernigowski, pe baza acestor date, apreciază că în producerea modificărilor măduvei roșii în condiții de hipoxie au mare importanță impulsurile de la zonele intero-receptoare sinocarotidiene și aortice.

Aceste rezultate par a fi opuse celor obținute de alți autori. Astfel Grant (1952), supunînd intermitent la o presiune de 400 mmHg, timp de 150 ore, iepuri cu sinusurile carotidiene denervate, observă, la aceștia o poliglobulie mai marcată decît la martori, pe care o explică prin scăderea mai exprimată a arterializării sîngelui la animalele respective. Poliglobulia nu se exagerează după denervarea zonei aortice.

Reluînd aceste experiențe, Terzioğlu, Göral și Bardavit (1955) observă la fel o poliglobulie mai exprimată în condiții de hipoxie după denervarea zonei sinocarotidiene, fără a o putea însă explica prin anoxemia mai exprimată sau prin modificări mai însemnate ale pH-ului sanguin, la animalele cu sinusurile carotidiene denervate. Autorii citați consideră ca necunoscută cauza creșterii mai însemnate a eritropoezei la animalele cu chemoreceptorii denervați, supuse anoxiei intermitente.

Rezultatele stabilite de Baci u și colab. (1961) elucidează această contradicție aparentă cu privire la rolul zonelor sinocarotidiene în adaptarea la hipoxie. Ele demonstrează existența a două mecanisme nervoase care sînt puse în activitate în condiții de hipoxie.

Unul din aceste două mecanisme, puse în joc de hipoxie, este reflex. Suprafața receptoare este reprezentată de chemoreceptorii sinocarotidieni, prin calea aferentă prin nervii lui Hering.

Calea efectoare a reflexului rezultă a fi reprezentată de măduva spinării și de nervii simpatici. De fapt, secționarea măduvei este urmată de imposibilitatea declanșării reacției eritrocitare prin hipoxie (Baciu și colab., 1957), iar excitarea capătului periferic al nervilor splanchnici produce — așa cum a arătat Linke (1955) pe iepuri — creșterea reticulocitelor și apariția normoblaștilor în sângele periferic.

Organele efectoare sînt reprezentate de splină și de măduva roșie (Cernigowski, Iaroșevski, 1957).

Reflexul descris asigură răspunsul imediat la condițiile de hipoxie. Prin trecerea hematiilor, depozitate în splină, în circulație și prin intensificarea lansării hematiilor și reticulocitelor medulare, acest reflex asigură eritrocitoza imediată. Simultan se produce creșterea ventilației pulmonare prin polipnee.

Al doilea mecanism de răspuns la hipoxia cerebrală este neuro-umoral. Spre deosebire de precedentul, el persistă după denervarea zonelor sino-carotidiene. După denervare, poliglobulia este mai exprimată, în condițiile experimentale descrise. După toate probabilitățile, hipoxia excită direct centrii nervoși vegetativi superiori. Calea efectoare e și în acest caz medulară, efectul asupra măduvei roșii realizîndu-se printr-o verigă umorală, reprezentată de secreția eritropoetinei.

Factorul de stimulare a eritropoezei apare în plasma animalelor supuse la hipoxie cefalică încă în primele ore de expunere, atît la animalele cu zonele carotidiene întregi, cît și după denervare. Creșterea eritropoetinei este mai însemnată și mai de durată la animalele denervate, ceea ce se poate explica prin reacția compensatorie neuroumorală provocată de lipsa adaptării reflexe imediate. De fapt la animalele denervate, reticulocitele și hematiile prezintă tendința la creștere abia în ziua a treia, pentru a atinge valori maxime în ziua a 4-a și a 5-a, spre deosebire de lotul martor la care eritrocitoza și reticulocitoza apar după 24 ore. Acest tip de reacție e întru totul asemănător cu reacția eritrocitară provocată în urma administrării de eritropoetină, zilnic în trei doze consecutive (Baciu și colab., 1959).

În legătură cu dependența între reglarea nervoasă și umorală a eritropoezei, rezultatele expuse demonstrează eliberarea factorilor umorali sub influența reglatoare nervos centrală.

Interpretarea producerii poliglobuliei prin anoxia stagnantă în măduva osoasă, datorită fibrozei capilare, care împiedică difuziu-

nea oxigenului spre elementele eritrocitare ale măduvei, poate fi acceptată numai în măsura în care difuziunea spre receptori sinocarotidieni sau spre centri nervoși, cu rol în reglarea eritropoezei, e împiedicată din cauza fibrozei generale capilare.

LOCALIZAREA STRUCTURILOR CENTRAL NERVOASE DE REGLARE

Cercetări experimentale prin stimulare electrică sau provocare de leziuni, precum și o serie de observații clinice arată că hipotalamusul participă la influențarea numărului de reticulocite și hematii circulante.

Astfel, în anul 1927, Schulhof și Mathies constată politemie durabilă la iepuri după injectarea de kieselgur în porțiunea proximală a centrilor vegetativi ai creierului. După înțeparea mecanică a zonei diencefalice sau după ligatura arterei carotide la iepuri, Heilmeyer (1923) obține reticulocitoză, care nu se mai produce în urma secționării măduvei spinării în regiunea cervicală. Secționarea măduvei în zona lombară nu influențează reacția reticulocitară astfel provocată.

Hayashida (1936) din școala lui Komiya (1956) localizează mai strict zona hipotalamică cu rol în reglarea tabloului celular sanguin în tuber cinereum.

Beer (1939, 1942), în cercetări experimentale sistematice, după ce injectează aer în ventriculul III, obține leucocitoză și reticulocitoză și precizează că, în urma stimulării mecanice a centrilor vegetativi, se eliberează factori umorali cu rol de stimulare a hematopoezei.

Stimulări electrice ale unor zone mai bine delimitate ale hipotalamusului, urmate de reticulocitoză și poliglobulie, au efectuat Wespî (1944), din școala lui Hess și Pșegalinski (1944), din școala lui Benetato (1944).

Importante pentru reglarea hipotalamică a eritropoezei sînt cercetările experimentale pe cîini ale lui Bonvallet și colab. (1951) care, după distrugerea bilaterală a hipotalamusului anterior, observă cu regularitate apariția unei anemii, cu conservarea însă a capacității acestor animale, în perioada anemiei consecutive lezării, de a răspunde la hemoragie prin reticulocitoză și restabilirea nivelului hematiilor circulante la valori anterioare hemoragiei.

Analizate critic, aceste cercetări, dintr-o epocă în care nu se putea aprecia cantitativ funcția eritropoetică, când mijloacele stereotaxice și electrofiziologice de localizare în sistemul nervos central erau limitate, aduc numai argumente și nu dovezi categorice, că compoziția sîngelui este reglată printr-un mecanism nervos central.

Tocmai din acest motiv cercetările asupra reglării eritropoezei au fost preluate în ultimii ani cu metodologia modernă, care permite localizări exacte în sistemul nervos central, pentru a stimula sau distruge și pentru a urmări modificările cantitative ale eritropoezei în raport cu factorul umoral de stimulare, eritropoetina.

Cu asemenea procedee, Seip și colab. (1961, 1963), Halvorsen (1966), în experiențe pe iepuri, descriu că stimularea electrică a hipotalamusului produce reticulocitoză, cu creșterea volumului globular total, în unele din experiențe. La un număr mai redus de animale, Halvorsen (1961) găsește și creșterea activității eritropoetice a plasmii sanguine după stimulare, prin testare pe șoricei în inanție, după reticulocitoza și viteza includerii ^{59}Fe în eritrocite. Distrugerea hipotalamusului, cu deosebire în zona posterioară (Halvorsen, 1961), atenuează reacția eritrocitară la hipoxie. Pe maimuțe Rhesus, cu doi electrozi implantați în hipotalamusul stîng, unul în area supraoptică și altul în zona nucleului peripeduncular și a corpului geniculat extern, Mirand și colab. (1964) stimulează, cu parametrii diferiți ai curentului, cele două zone zilnic, 4—6 zile în șir. Autorii găsesc după stimulare cantități mari de eritropoetină în plasma animalelor, confirmînd astfel concepția lui Halvorsen (1964), după care hipoxia ar putea determina eliberarea de eritropoetină, prin intermediul centrilor hipotalamici, pe care îi stimulează direct.

Mirand și colab. (1964) nu pot preciza, pe baza cercetărilor lor, dacă rolul eritroreglator revine zonei anterioare sau posterioare a hipotalamusului; ei apreciază totuși că nucleul supraoptic este cel care ar putea interveni prin intermediul producerii de neurohormoni.

Rezultate asemănătoare obțin, în 1966, Feldman și colab., în urma stimulării hipotalamusului posterior la șobolani zilnic, mai multe zile consecutiv, prin electrozi implantați cronic. Totuși, autorii citați nu pot evidenția creșterea titrului eritropoetinei circulante. Ei interpretează efectele stimulării electrice ca realizîndu-se direct pe calea sistemului vegetativ. Divergența rezultatelor obținute, cu ale celorlalte două grupe de cercetători citați, o explică prin efectuarea experiențelor analizate pe trei specii diferite.

Alții n-au putut evidenția influențe hipotalamice asupra eritropoezei. Astfel, Piliero și colab. (1962) nu găsesc diferențe în

răspunsul eritropoetic la hipoxie de lungă durată între șobolani martori și cei cu leziuni electrolitice în hipotalamusul posterior, iar Barbașova și colab. (1959), după simpatectomie totală și adrenalectomie bilaterală, interesând zona medulară la șobolani, constată un răspuns eritrocitar, la altitudine simulată de lungă durată, întru totul identic cu cel al animalelor de control.

Localizarea centrilor nervoși care controlează eritropoeza a fost studiată pe șobolani adulți (Baciu, Stoica, Răducanu, 1965).

Animalelor de experiență li s-a practicat, în coordonatele stereotaxice ale lui De Groot (1959), cu ajutorul unor electrozi bipolari de oțel, prin electrocoagulare, leziuni bilaterale simetrice, sub formă de coloană, la distanță de 0,5—1 mm față de linia mediană în regiunile următoare ale creierului: formația reticulară bulbară, encefalică, hipotalamusul anterior și posterior, zone care ar putea interveni în reglarea eritropoezei (fig. 53).

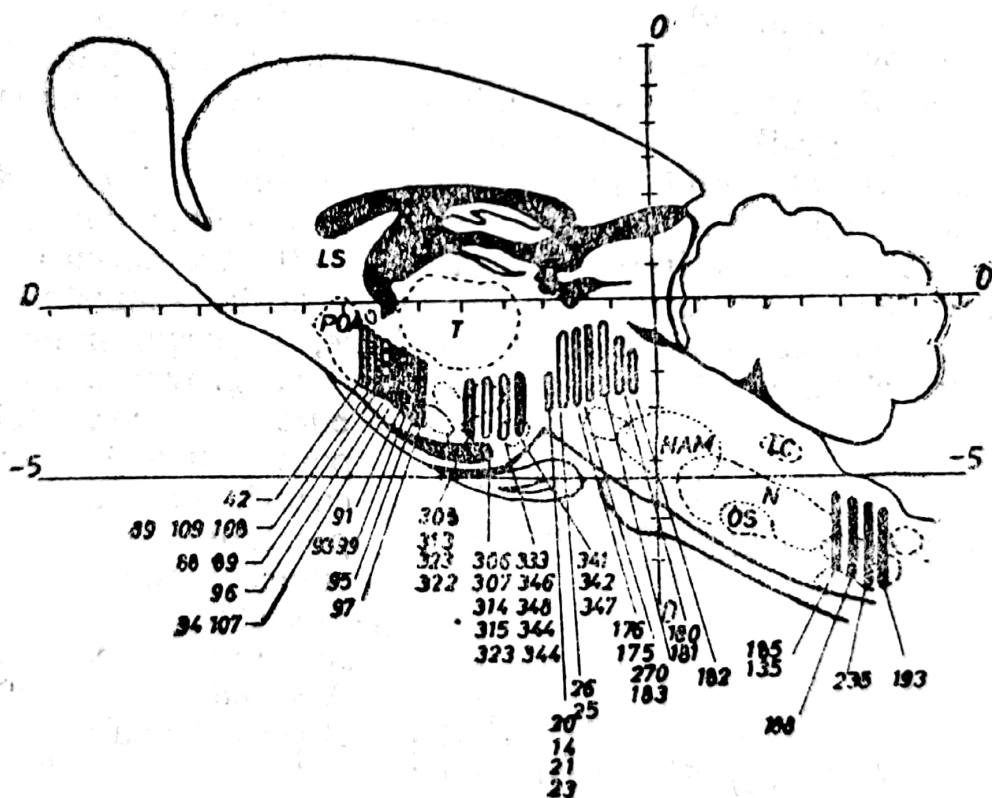
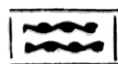


Fig. 53. Reprezentarea schematică a zonelor cu leziuni electrolitice și influența lor asupra eritropoezei: leziuni inactive (control);



cu efecte moderate;



cu efecte inhibitorii.

A cincea sau a șaptea zi după provocarea leziunilor, animalele au fost expuse zilnic la o altitudine simulată de 5000 m sau 6000 m, într-o cameră barometrică de decompresie. Durata totală a hipoxiei hipoxice astfel realizată a fost de minimum trei zile (72 ore). Examenul hematologic, constând în numărarea reticulocitelor, exprimate la mie, și a hematiilor, a fost efectuat înainte de operație, după aceea, înainte și după decompresia în camera barometrică hipobară.

Pe animalele de experiență sacrificate la sfârșit, s-a făcut controlul plasării leziunilor și a extinderii acestora, practicând secțiuni microscopice în aceleași coordonate ale atlasului citat, după tehnica descrisă de Rössner și Zipf (1961). Diametrul leziunilor era de 0,2—0,4 mm; înălțimea de 1—2 mm.

Distrugerea hipotalamusului anterior și ventromedian, când interesează mai ales zona denumită *area hipotalamică anterior*, *area preoptica*, *nucleus periventricularis*, *ventromedialis* și *arcuatus*, se situează în coordonatele $A = 6,2 - 6,8$ mm; H (în coloană) —1,5 —3,5 cm, determină diminuarea răspunsului eritocitar în raport cu martorii. Numărul eritrocitelor nu crește deși răspunsul reticulocitar e semnificativ. Este de analizat în ce măsură leziunea acestei zone determină posibil o reacție hemolitică (fig. 54).

Distrugerea bilaterală, seriată a hipotalamusului posterior este urmată nu numai de blocarea răspunsului eritocitar, dar și de lipsa sa totală în timpul hipoxiei, dacă leziunile interesează o zonă situată în vecinătatea liniei mediane care cuprinde substanța cenușie periventriculară a ariei supramamilară, și corpii mamilari mediani și superiori. Dacă leziunile simetrice nu provoacă moartea în

cursul experienței, care poate surveni în 80% din cazuri, se constată o depresiune a eritropoezei, chiar în condiții de hipoxie. Zona menționată corespunde coordonatelor $A = 3,8$ mm; $L = 0,3$ mm; H (în coloană): —1 pînă la —3,8.

Reticulocitoza consecutivă distrugerii acestei zone însoțită de creșterea numărului eritrocitelor nu poate fi explicată ca efect exclusiv al opera-

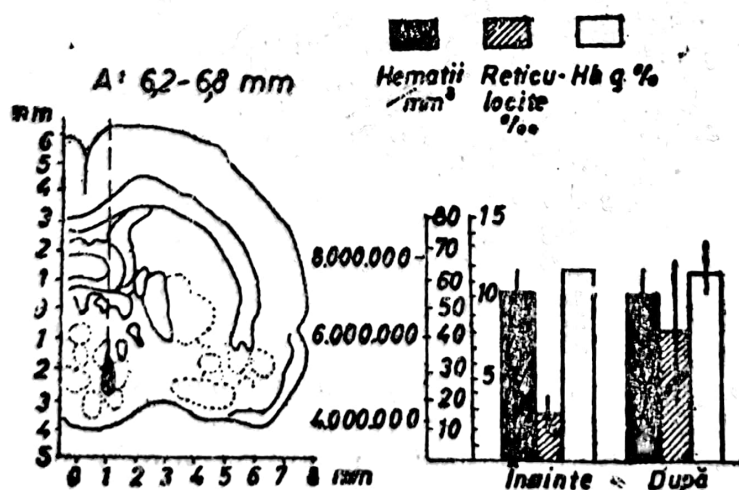


Fig. 54. Reacția eritocitară la hipoxie (72 ore la 5000 m altitudine simulată, în barocameră), consecutivă leziunilor în hipotalamusul anterior.

ției chirurgicale fiindcă ea e absentă la martori sau la șobolani cu leziuni situate în altă parte. E posibil că răspunsul eritrocitar consecutiv provocării leziunii în zona periventriculară mamară și supramamară să fie determinat prin stimularea mecanică cu ocazia pătrunderii electrodului de coagulare în această zonă sau încă, și aceasta în mod particular, prin stimularea electrică în cursul electrolizei și mai târziu prin țesutul necrotizat, și reacția inflamatorie și reparatorie din zona lezată. Nu se poate exclude nici posibilitatea ca zone întregi din vecinătatea zonelor lezate să asigure, alături de efectul de iritare lezională, o oarecare adaptare a eritropoezei, la stimulul hipoxic. Acest rest de capacitate de adaptare se epuizează totuși în a doua jumătate a perioadei de hipoxie hipobară de 21 de zile, în timpul căreia reticulocitele scad progresiv, în timp ce ele continuă să crească, la animalele de control. Insuficiența mecanismului de adaptare la hipoxie apare foarte evidentă îndată după hipoxia anemică provocată prin recoltarea unei cantități de sânge egală cu 20% în raport de greutatea corporală, la sfârșitul perioadei de 21 de zile de hipobarism. În timpul celor șapte zile care urmează hemoragiei, reticulocitele, ca și eritrocitele, scad progresiv la șobolani cu leziuni ale zonei supramamare și mamară, ceea ce dovedește blocarea mecanismului de răspuns eritropoetic la hipoxie (fig. 55).

Leziuni în formația reticulară mezencefalică ($L = 1,5 - 2,1$ mm; $A = 0,6 - 2,2$ mm; H (în coloană) $-0,5 - -2,5$ mm) nu produc

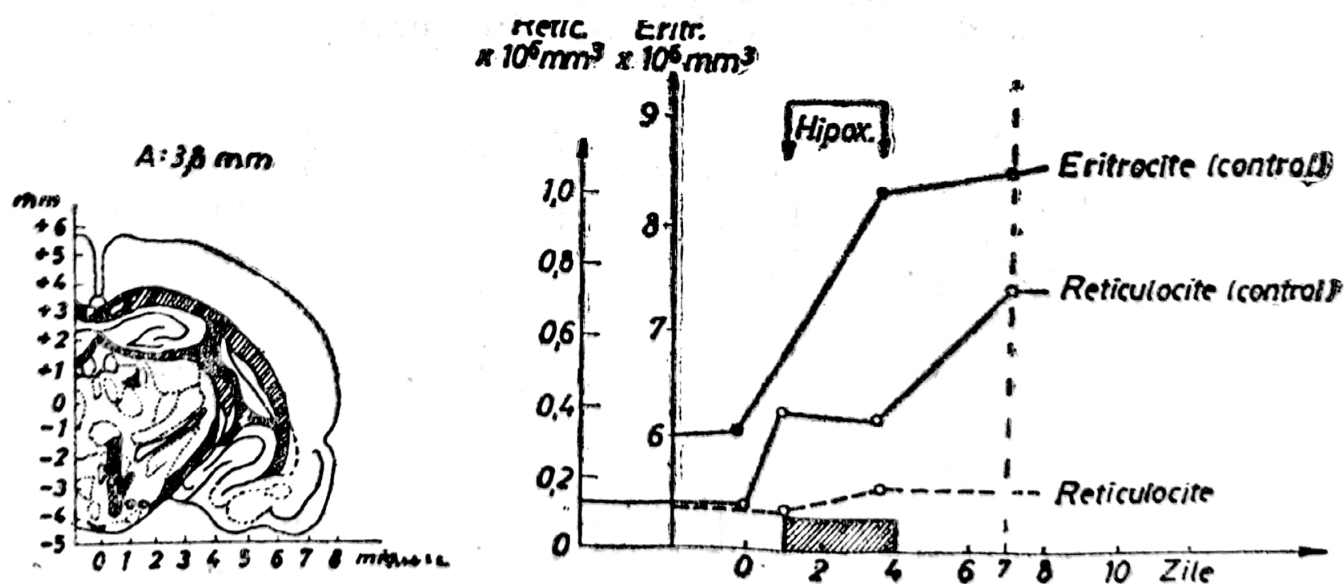


Fig. 55. Efectul leziunilor în hipotalamusul posterior asupra răspunsului reticulocitar în hipobarism la unul dintre șobolani în experiență. Reprezentarea schematică a leziunii.

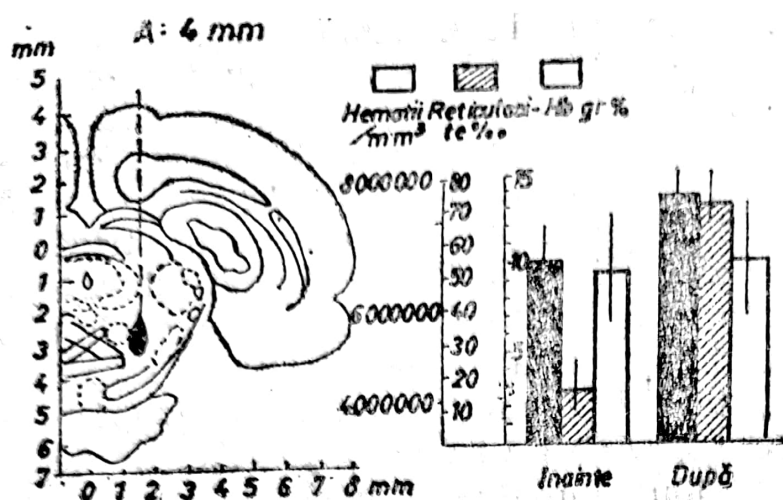


Fig. 56. Reacția eritrocitară la hipoxie (72 ore la 5000 m altitudine simulată în barocameră), consecutivă leziunilor în formația reticulară mezencefalică.

nici o modificare a reacției eritrocitare la hipoxie, aceasta fiind cea a martorilor (fig. 56).

Leziuni în formația reticulară bulbară au fost practicate în vecinătatea obexului și a olivei inferioare, interesând nucleul reticular medial. Coordonate: $L = 0,3 \text{ mm}$; $P = 5-6 \text{ mm}$ și H (în coloană) $= -5,0 - -6,0 \text{ mm}$.

La cinci șobolani cu leziuni bilaterale destul de extinse în zona menționată, răspunsul la hipoxia hipobară de 72 ore nu a mai putut fi constatat.

Cînd leziunea interesează exclusiv nucleii somatici bulbari, din vecinătatea planșeului ventriculului al patrulea, cînd leziunea este unilaterală sau cînd ea apare pe linia mediană, răspunsul eritrocitar prezintă o amplitudine egală cu cea constatată la martori (fig. 57).

Abolirea răspunsului eritrocitar la hipoxie, la șobolani, după distrugerea formației reticulare bulbare, a cărei sensibilitate la hipoxie este cunoscută, sugerează localizarea bulbară a unuia din mecanisme centrale de răspuns la hipoxie, sau afectarea căii efectoare.

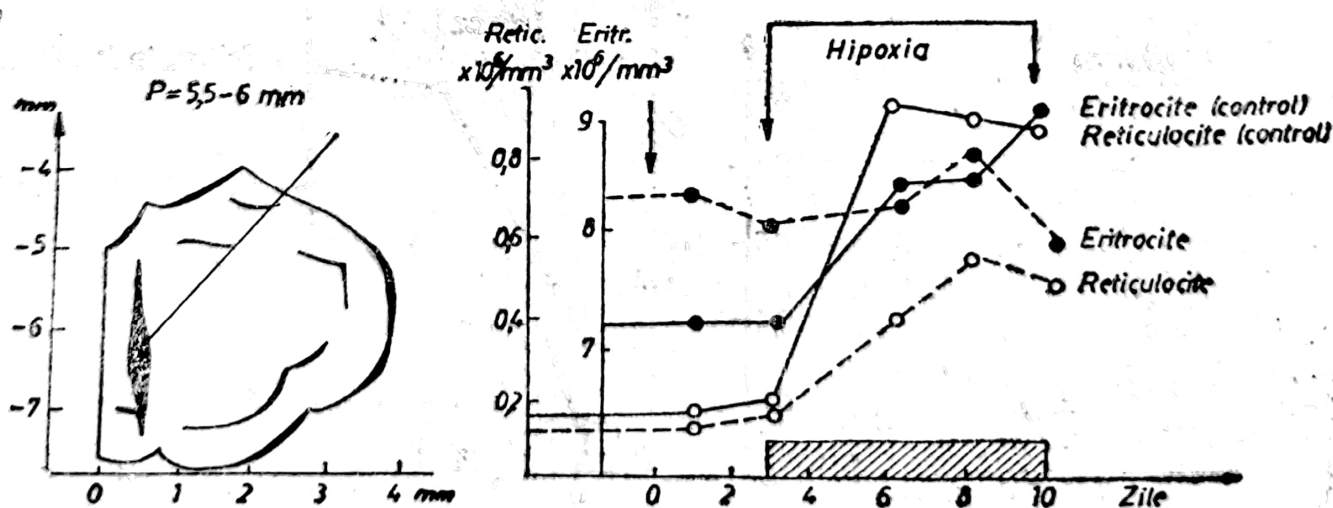


Fig. 57. Reacția eritrocitară la hipoxie (72 ore la 5000 m altitudine simulată în barocameră), consecutivă leziunilor în formațiunea reticulară bulbară.

Dacă rezultatele expuse demonstrează, în acord cu cele ale lui Seip și colab. (1963), Halvorsen (1961, 1964, 1966), Mirand și colab. (1964), Linke (58), Feldman și colab. (1966), că hipotalamusul posterior participă la reglarea eritropoezei, ele nu pot preciza dacă aceasta se face pe cale nervoasă directă sau pe cale neuro-umorală, prin secreția de eritropoetină într-un organ efector, sub influența stimulului hipoxic.

Baciu și colab. (1965) au demonstrat complementar rezultatelor expuse că activitatea electrică a zonelor hipotalamice și bulbare, a căror distrugere atenuază răspunsul eritrocitar la hipoxie, se intensifică progresiv în timpul scăderii tensiunii oxigenului în barocameră — în experiențele de ascensiune simulată — ceea ce ilustrează stimularea lor în condiții de hipoxie (fig. 58 a și b).

Fără a putea analiza în detaliu aceste rezultate, reținem totuși ca demonstrat și confirmat faptul că regiunea hipotalamică și reticulară bulbară au un rol important în activarea eritropoezei sub acțiunea stimulului hipoxic.

Între rezultatele lui Baciu și colab. (1965), Mirand și colab. și cele ale lui Halvorsen (1961), Feldman, Rachmilewitz și Izak (1966) există o deosebire, în sensul că cei dintii

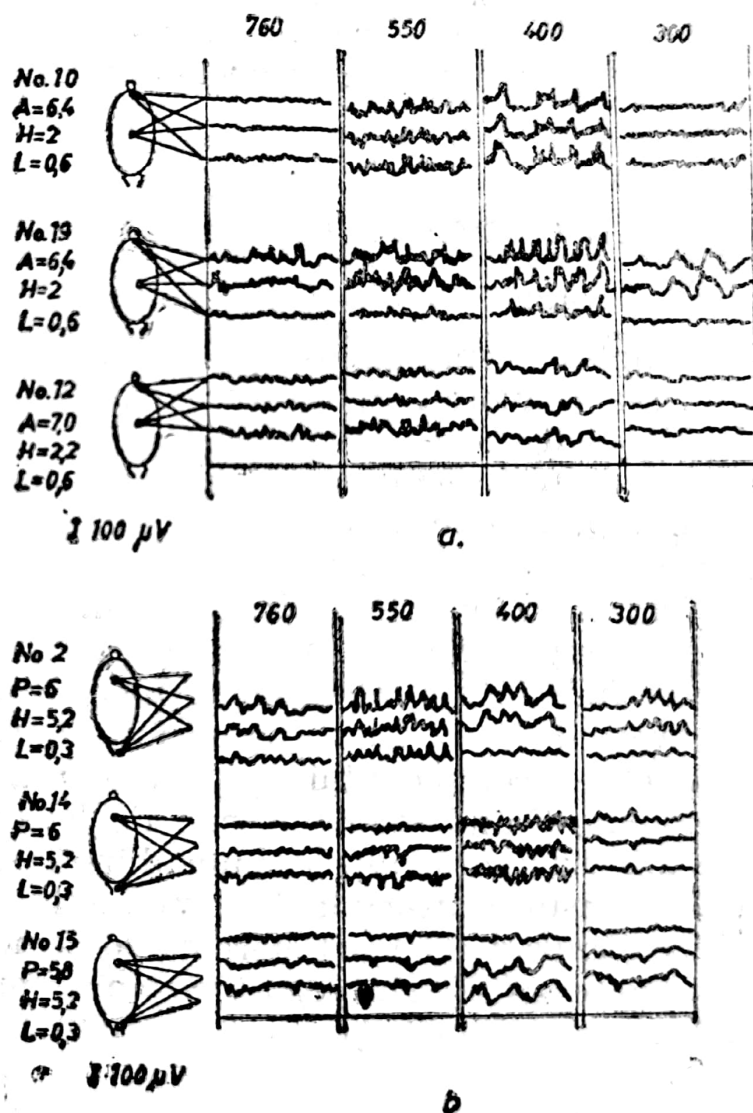


Fig. 58. a. Activitatea electrică în cursul hipoxiei hipobare la animalele cu electrode implantate în hipotalamusul anterior în coordonatele atlasului lui De Groot (3 experiențe). b. Activitatea electrică în cursul hipoxiei hipobare la animalele cu electrode implantate în formațiunea reticulară bulbară în coordonatele atlasului lui De Groot (3 experiențe).

atrag atenția și asupra centrilor din hipotalamusul anterior. În ce măsură participarea hipotalamusului anterior în reacția eritrocitară este specifică sau nespecifică, prin intermediul cortico-suprarenalei și tiroidei și modul în care această participare este corelată cu zonele hipotalamusului posterior, necesită încă cercetări.

Insistăm asupra rolului formațiunii reticulare bulbare în reglarea eritropoezei, stabilit de B a c i u și colab. (1965) în aceste investigații, pentru motivul că M. Terzioğlu (1965) aduce argumente indirecte pentru existența unei corelații funcționale între centrul respirator și cel de reglare a eritropoezei. Este, de asemenea, o direcție de studiu relativ la mecanismele homeostaziei oxigenului, în care, în viitor, este necesar să se aducă noi precizări.

ROLUL COMPLEXULUI EPITALAMO-EPIFIZAR ÎN ERITROPOEZĂ

Complexul epitalamo-epifizar, avînd strînse legături cu rinencefalul, s-a dezvoltat în legătură cu stimulii chimici din mediul înconjurător de care este legată activitatea paleocortexului. Apariția neocortexului a schimbat raporturile funcționale în favoarea sistemului hipotalamic care — în conexiune cu formațiunea reticulată și neocortexul — a devenit funcțional predominant în integrarea reacțiilor de adaptare la diferiți stimuli. Au apărut noi conexiuni între sistemul epitalamo-epifizar și cel hipotalamic — cu numeroase aspecte funcționale, neelucidate pînă în prezent. Pentru acest motiv s-a urmărit (B a c i u, G o z a r i u, R ă d u c a n u, S t o i c a, 1968) participarea complexului epitalamo-epifizar în reacția de adaptare la hipoxie, ținînd seama tocmai de legăturile anatomice și funcționale ale sistemului hipotalamico-hipofizar cu cel epitalamo-epifizar.

Răspunsul eritrocitar la hipoxie la șobolanii martor și la cei epifizectomizați bilateral stereotaxic demonstrează că anularea funcțională a epifizei și zonelor învecinate nu modifică, în final, intensitatea reacției eritropoetice la stimulul hipoxic (altitudine simulată 5500 m). Se obțin însă modificări în sensul accelerării în timp și creșterii în amplitudine a răspunsului eritropoetic la epifizectomizați, comparativ cu martorii. Aceste supra valori sînt trecătoare, datorită, probabil, intervenției mecanismelor de reglare-compensare.

Influența epifizei asupra mecanismului hipotalamo-hipofizar de adaptare eritropoetică la hipoxie pare să nu fie specifică. Pentru aceasta pledează și creșterea în greutate a animalelor epifizectomi-

zate (+8,86%), față de scăderea martorilor (—5,71%) semnalată și de alți autori (Ishibashi, 1966), simultan cu activarea cunoscută în cercetări anterioare a secreției endocrine gonadice (Foa, 1912) și tiroidiene (Ishibashi și colab., 1966), hormoni stimulatori ai eritropoezei.

În acest fel rezultă că epitalamusul și epifiza intervin în sens modulator asupra reacției eritropoetice la hipoxie, lezionarea avînd ca urmare facilitarea sistemului hipotalamo-hipofizar. Interrelațiile funcționale epitalamus-epifiză și hipotalamus-hipofiză cunoscute pînă în prezent pledează pentru o astfel de explicație. Șobolanii expuși la luminare intensă, prelungită, prezintă epifize mici, de greutate semnificativ inferioară celei a martorilor. La femele se instalează o stare de estru permanent (Fiske și colab. cit. Soularic și Soularic (1963). Animalele ținute la întuneric prezintă o inhibiție a eritropoezei (Hollowich F.).

Dezvoltat în legătură cu neocortexul, cu formațiune reticulară a trunchiului cerebral și sub influența stimulilor complecși din mediul de viață — luminoși, auditivi, somestezici sau viscerali — sistemul hipotalamic cîștigă, la animalele superioare, o importanță nouă. Influențele rinencefalului, prin fasciculul medial prozencefalic (fornix), atît asupra epitalamusului, cît și asupra hipotalamusului, precum și antagonismele arătate între ele, precum și faptul că fasciculul medial prozencefalic se termină în corpii mamilari și că distrugerea hipotalamusului posterior atenuază semnificativ reacția eritrocitară la hipoxie (Baciu și colab., 1968), ridică problema exercitării efectului modulator al sistemului epitalamo-epifizar prin intermediul acestor formațiuni.

ROLUL SIMPATICULUI

Calea eferentă, prin care centrii nervoși vegetativi superiori cu rol în reglarea eritropoezei acționează, activînd eritropoeza, ar putea fi umorală, pusă în joc printr-un mecanism hipotalamo-hipofizar, sau reprezentată de nervii efectori vegetativi simpatici sau parasimpatici. Se mai pune problema în ce măsură mecanisme celulare locale ar putea interveni în biogeneza eritropoetinei.

Baciu și colab. (1957) au arătat că, după secționarea măduvei spinării, în regiunea cervicală la șobolani, expunerea acestora la hipoxie hipobară nu este urmată de răspuns eritrocitar, în următoarele 4—5 zile.

Dacă — așa cum datele experimentale o demonstrează — stimularea centrilor nervoși superiori, cu rol în reglarea eritropoezei, se face direct, pe cale umorală de sîngele hipoxic, reacția efectoare, răspunsul eritrocitar, în cazul unei căi descendente umorale, ar urma să fie nemodificat după secționarea măduvei spinării. Cum însă, întreruperea acestei căi atenuează acest răspuns, apare un prim argument relativ la rolul căilor vegetative descendente medulare în secreția de eritropoetină, declanșată prin mecanism nervos.

Aceste date infirmă și ipoteza după care stimulul hipoxic, acționînd asupra unor neuroni centrali sensibili la hipoxie, ar produce eliberarea în hipotalamus a unui „erythropoietin releasing factor“, care, pe cale umorală, determină formarea în rinichi de eritropoetină, prin activarea factorului renal (M i r a n d, 1968).

Rezultate mai evidente privind rolul sistemului simpatic în producerea eritropoetinei părea să fi adus încă L i n k e (1955) care a descris reticulocitoză la stimularea electrică a nervilor splanchnici. Alți cercetători obțin însă rezultate diferite, neconcludente (vezi F i n k și F i s h e r, 1977). După ce s-au adus argumente asupra rolului rinichiului în secreția de eritropoetină, a devenit firesc să se pună problema dacă procesul nu este mediat neural. T a k a k u și colab., (1962) au arătat că secționarea bilaterală a nervilor splanchnici la șobolan inhibă marcat secreția de eritropoetină și răspunsul reticulocitar posthemoragic.

B a c i u și col. (1963), pe cîini cu „cap izolat“ cronic și cu transplant renal în regiunea gîtului, urmat de înlăturarea celui alt rinichi, deci pe animale cu rinichiul unic, denervat prin autotransplantare în altă zonă, au arătat că hipoxia ischemică arterială cefalică produce eritropoetină. La fel F i n n e și S k o g l u n d (1970) găsesc secreție nemodificată de eritropoetină, la șobolanii splanchniectomizați bilateral și apoi expuși la hipoxie, anemiați prin hemoragie.

În cercetări pe subiecți umani cu transplante renale în anii 1966—1967, o serie de autori (vezi F i n k și F i s h e r, 1977) au arătat că secreția de eritropoetină se produce independent de orice influență simpatică. M i r a n d și M u r p h y (1968, 1969, 1970), în experiențe pe cîini, obțin rezultate după care simpaticul exercită exclusiv o influență modulatorie asupra secreției de eritropoetină.

Într-o altă serie de investigații a fost urmărită influența catecolaminelor circulante asupra producerii eritropoetinei și eritropoezei.

Efectul hipoxiei asupra secreției de catecolamine a fost studiat, dar cu rezultate contradictorii. Astfel, în timp ce C u n n i n g h a m și colab. (1965), K o r n e r și W h i t e (1966) găsesc creșterea catecolaminelor la hipoxie, T o y o k a și colab., S u r k e s și

colab. (1967) constată, în cursul unei ascensiuni în timp de 8 zile la 1800 m, creșterea eliminării urinare a noradrenalinei și AVM, în timp ce adrenalina rămâne nemodificată. Contrar acestora, Becker și Kreutzer (1968) descriu, la subiecți umani sănătoși, expuși timp de $1\frac{1}{2}$ —2 ore la altitudinea simulată de 3000—4000 m, creșterea adrenalinei și AVM urinar, fără modificări ale noradrenalinei. Corelarea răspunsului simpato-adrenal la hipoxie cu reacția eritocitară a fost studiată (Baciu, Derevenco, Sovrea, Pereni, Popa, 1969) pe câini expuși, timp de două pînă la opt ore, la o altitudine simulată de 5600 m și 7000 m. Animalele erau preparate cu fistule ureterale duble, mucoasa vezicii urinare fiind suturată la abdomen. Aceasta permitea recoltarea urinei fără pierderi în porțiuni strict determinate în timp, utilizînd pungi de material plastic fixate pe animal. Urina s-a recoltat la intervale de 2, 4, 8, și 12 ore de expunere, cît și pe perioade de 4 ore înainte și după expunere.

Din urină s-au extras global, cu acetat de etil, metaboliții acizi ai catecolaminelor, care au fost apoi fracționați electroforetic la înaltă tensiune și după identificarea cu substanțe test, eluați și dozați fotometric, după o tehnică descrisă în altă parte (Baciu, și colab., 1967). Exprimarea valorilor aflate s-a făcut în $\mu\text{g/kg/oră}$.

Se constată, după 4 ore de expunere la 5600 m, creșterea excreției urinare de acid para-hidroximandelic la valori ce depășesc dublul excreției. Excreția de AVM se modifică puțin sau rămâne nemodificată. La 7000 m, după primele două ore, excreția de AVM crește de 3—5 ori. Creșteri de același ordin prezintă AHM. Expunerea peste durata de 4 ore, nu mărește mai mult excreția urinară de metaboliți. Restituția are loc în curs de 4 ore (fig. 59).

Întrucît din datele expuse rezultă o puternică activare a secreției de metaboliți ai catecolaminelor în condițiile expunerii la hipoxie avansată, s-a urmărit și efectul adrenalectomiei asupra răspunsului eritocitar. Cercetările au fost efectuate pe trei loturi de șobolani albi Wistar. La animalele din două loturi li s-a practicat suprarenalectomie lombară bilaterală. După intervenție, animalele unui lot au fost tratate cu cortizon Merck (1,25 mg/100 g zilnic), iar ale celuilalt cu aldosteron (Aldocorten Ciba, 0,015 mg/100 g greutate zilnic). Ambele loturi au fost supuse hipoxiei hipobare (altitudine simulată de 5600 m, corespunzînd unei presiuni de 370 mmHg). Al treilea lot nesuprarenalectomizat a fost expus în aceleași condiții, servind pentru control. Loturile suprarenalectomizate au primit ad libitum apă clorurată. Evaluarea reacției eritocitare s-a făcut prin numărarea hematiilor și reticulocitelor și ex-

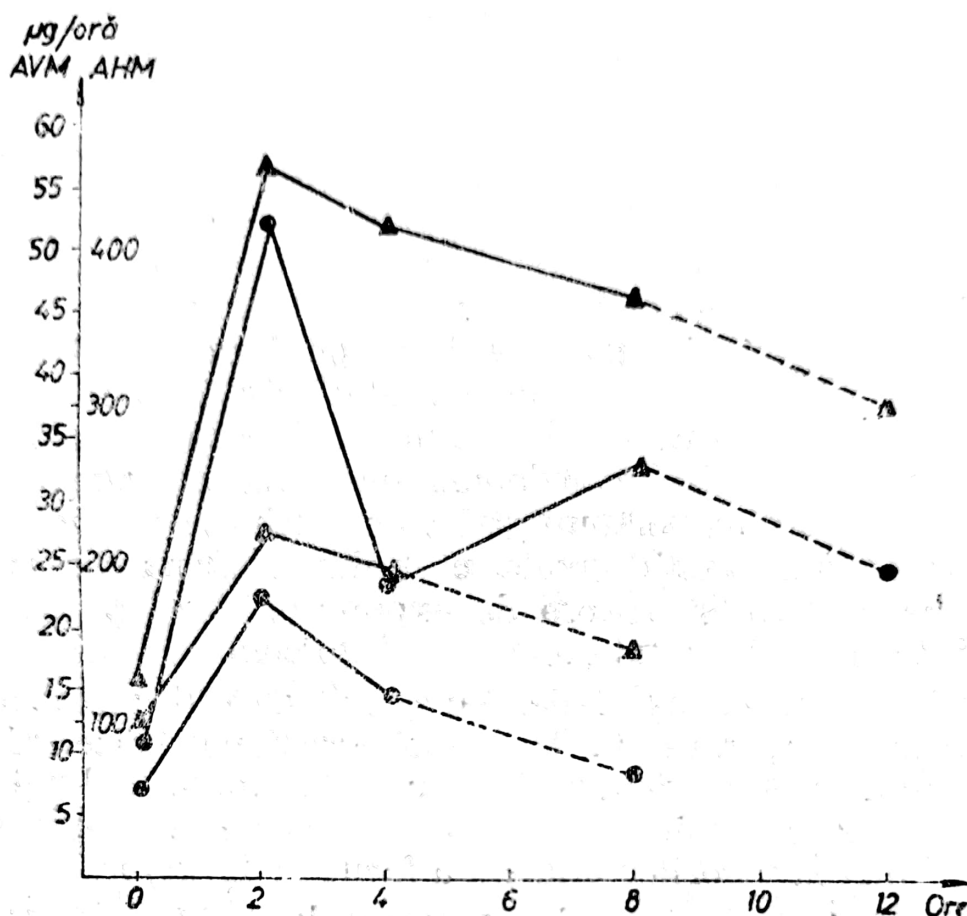


Fig. 59. Modificări tipice de excreție a AVM și AHM după expuneri de 4–8 ore la 7000 m.

●—● = acidul vanilmandelic (A VM) ;
 ▲—▲ = acidul p-hidroximandelic (AHM) ;
 — — — = perioada posthipoxică.

primarea lor la 1 mm³ sînge, înainte de expunere și la 4 și 5 zile de expunere continuă la hipoxie.

În fig. 60 reproducem grafic modificările reticulocitelor circulante sub influența hipoxiei la animalele de control și la animalele suprarenalectomizate.

Rezultă din analiza acestui grafic, că după suprarenalectomie și înlăturarea prin aceasta a producerii de adrenalină, răspunsul reticulocitar persistă, dar că numărul reticulocitelor circulante, la lotul tratat cu aldosteron, apare în ziua a 4-a de hipoxie redus cu aproape 50% față de lotul de control, deși diferența în cadrul acestui lot între reticulocitoza inițială și cea din ziua a 4-a este foarte semnificativă.

Datele obținute atrag atenția asupra atenuării marcate a răspunsului eritrocitar în lipsa medulosuprarenalei, producătoarea principală de adrenalină (cu suplerea corticosuprarenalei) dar ele nu sînt

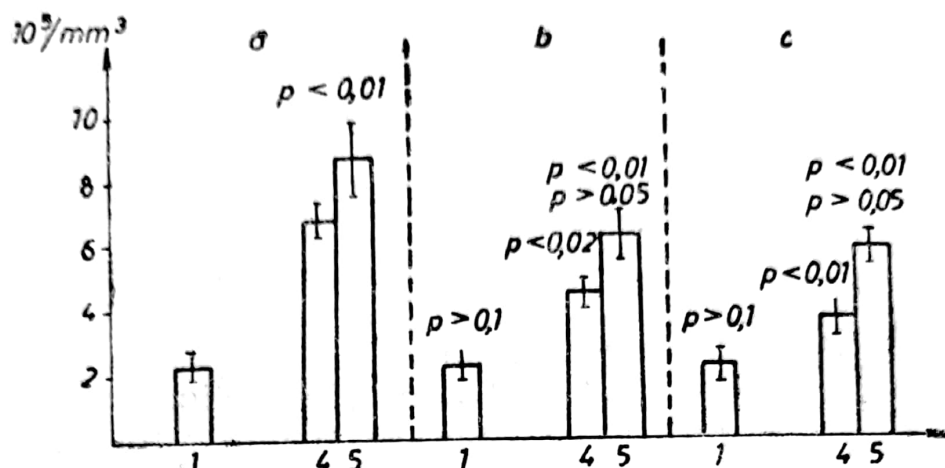


Fig. 60. Reacția reticulocitară a șobolanilor la hipoxie hipobară (5500 m) la martori (a) și la animale adrenalectomizate, tratate cu cortizon (b) sau aldosteron (c), în zilele 4 și 5 de la expunere. Coloana 1 reprezintă valorile inițiale. a. martori neoperați; b. animale adrenalectomizate tratate cu cortizon; c. animale adrenalectomizate tratate cu aldosteron; 1. înainte de expunere; 4 și 5 = ziua a 4-a a resp. a 5-a de expunere la hipoxie; p = semnificația statistică a diferențelor dintre valorile reticulocitelor găsite înainte de expunere la hipoxie și dintre valorile din zilele 4-5; P_2 = diferențele dintre loturile tratate cu aldosteron și cortizon și dintre lotul martor.

concludente, întrucât în modelul realizat rămân intacte terminațiile simplice adrenergice, cu efecte asupra receptorilor beta.

S-a recurs în aceste condiții la un alt model experimental, realizat la fel pe șobolan, la care s-a efectuat chirurgical simpatectomia lombară bilaterală, cu conservarea ganglionilor celiaci și a glandelor suprarenale (Baciu, Albu și colab., 1974). Așa cum reiese din fig. 61, la șobolanii simpatectomiizați lombar și tratați cu β -blocant Inderal (propranolol), răspunsul eritrocitar, testat prin incorporarea ^{59}Fe , după expunerea la altitudine de 5600 m, se desfășoară similar, fiind însă de amplitudine mai redusă.

Rezultă deci că eliminarea simpaticului lombar se resimte asupra activării eritropoezei sub acțiunea hipoxiei prin atenuarea răspunsului, ceea ce pledează pentru intervenția și a altor mecanisme în această activare.

În completarea acestor cercetări, Baciu, Vitebski, Pavel, Pereni (1969) au utilizat ca blocant alfa Regitina (N-p. tolol-N-m-hidroxifenil-aminoetil)-2 imidazolina 1 mg/kg zilnic, iar ca beta-blocant, Inderal, 2 mg/kg/zilnic.

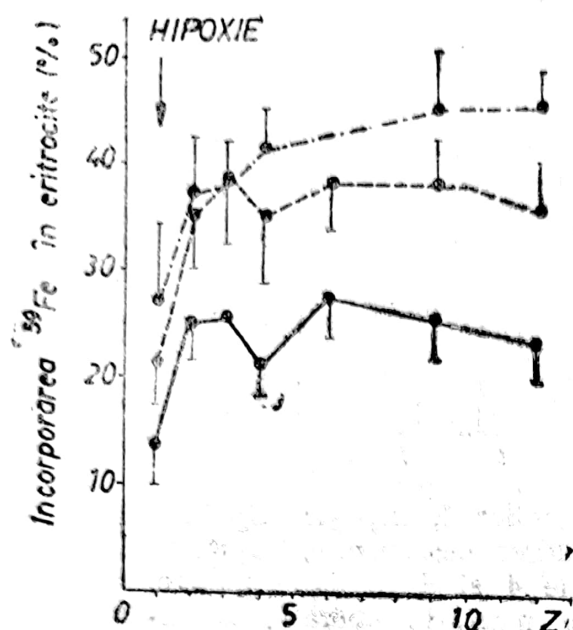


Fig. 61. Efectul serului de șobolan menținut la hipoxie hipobară (altitudine simulată de 5000 m), la diferite intervale de timp asupra incorporării ^{59}Fe în hematiile șoarecilor policitemici hipertransfuzati.

- martori
- betablocați
- .-.- betablocați la simpatectomi-zați lombar.

Șobolanii de experiență, grupați în două loturi de animale blocate și un lot de control, au fost menținuți în camera barometrică 10 ore zilnic, la o altitudine simulată de 5500 m timp de 15 zile.

Rezultatele obținute, așa cum reiese din fig. 61 și 62 arată că la animalele tratate cu beta-blocant răspunsurile reticulocitar și eritrocitar sînt semnificativ diminuate față de cele ale animalelor de control. În același timp se reduce rata incorporării ^{59}Fe în eritrocite.

Datele expuse concordă cu rezultatele lui Fink și Fisher (1974, 1976) relativ la rolul simpaticului beta-adrenergic în activarea eritropoezei. Atît din rezultatele grupului nostru de cercetare, cît și din cele ale autorilor citați, reiese intervenția certă și de amplitudine a simpaticului, fără a susține că acesta este unicul mecanism (fig. 63).

REGLAREA ERITROPOEZEI PRIN MECANISM NERVOS PERIFERIC

De fapt, reglarea eritropoezei prin mecanism nervos central nu exclude existența unui mecanism pur periferic de reglare, menținut sub influența produselor de hemoliză, fiind, în același timp, expresia inerției activității celulare și a echilibrului periferic. Dacă se secționează măduva spinării la șobolani și după vindecare animalele sînt expuse la hipoxie, se constată, în raport cu martorii, persistența unui răspuns eritrocitar mai tardiv și de amplitudine redusă (Baciu, 1964).

Același caracter îl are răspunsul eritropoetic după expunerea la hipoxie hipoxică în camera barometrică (altitudine simulată de 5500 m) a căteilor nou-născuți al căror sistem nervos nu este încă dezvoltat, precum și a șobolanilor adulți cărora li s-au făcut leziuni în hipotalamusul posterior, sau în formația reticulară bulbară (Baciu, Dorofteiu, Olteanu, Pavel, 1971). La aceste ani-

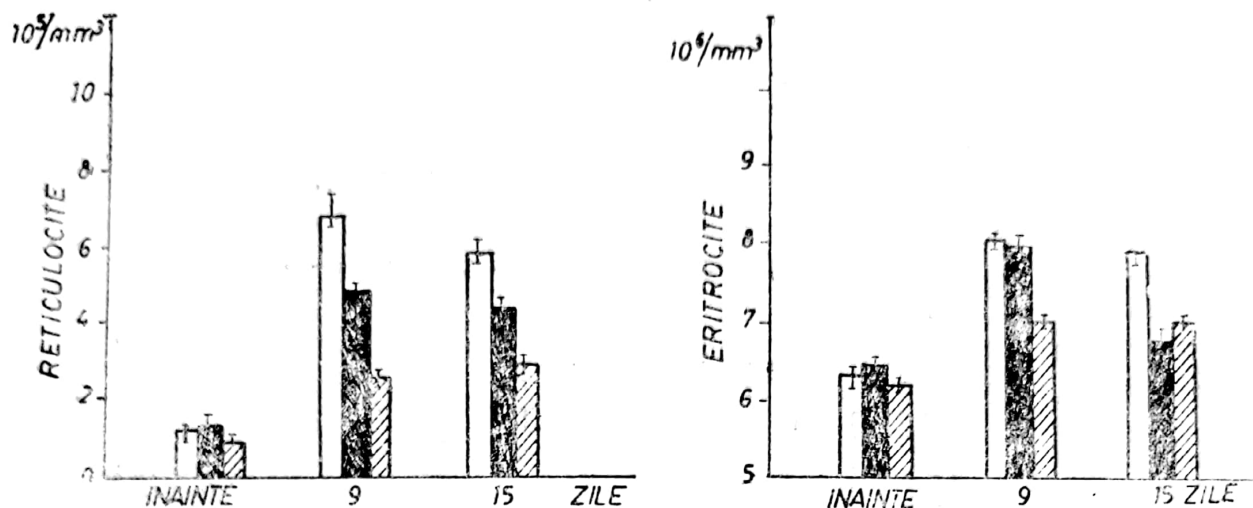


Fig. 62. Modificările reticulocitelor și eritrocitelor la șobolanii expuși la hipoxie hipobară timp de 15 zile (altitudine simulată de 5500 m). animale martor; tratate cu Regitină; tratate cu Inderal.

male, apare eritropoetina și consecutiv răspunsul eritropoetic declanșat de ea, dar numai după o perioadă mai prelungită de latență, fiind de amplitudine mai redusă. Se poate presupune că în aceste cazuri acțiunea directă a hipoxiei este factorul care — posibil prin eliberarea unor enzime lizozomale cu funcție eritrogenetică — să determine formarea eritropoetinei printr-un mecanism periferic ce-

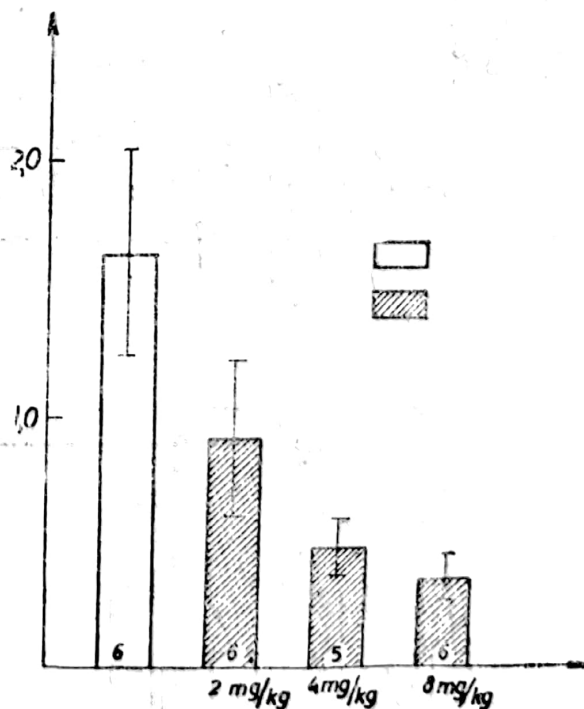
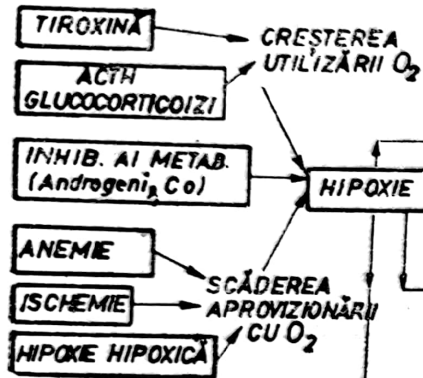


Fig. 63. Efectul DL-propranololului asupra producției de eritropoetină la iepurii expuși la hipoxie (0,42 atm) timp de 18 ore. Patru iepuri au fost supuși la hipoxie simultan, fiecare primind o doză diferită de DL-propranolol. Eritropoetina (Ep) exprimată ca unități, determinată din linia de regresie doză-răspuns, obținută prin administrarea unor cantități cunoscute de eritropoetină urinară umană (preparat internațional standard B) la șoareci policitemici. Valorile exprimate ca medii $\pm$ sc. Numărul de la baza fiecărei coloane indică numărul de iepuri per/grup. Asterixul indică o diferență semnificativă (Testul t Dunnett) față de martorii cu ser fiziologic ($p < 0.05$).

REGLAREA ERITROPOEZEI

FACTORI STIMULATORI:

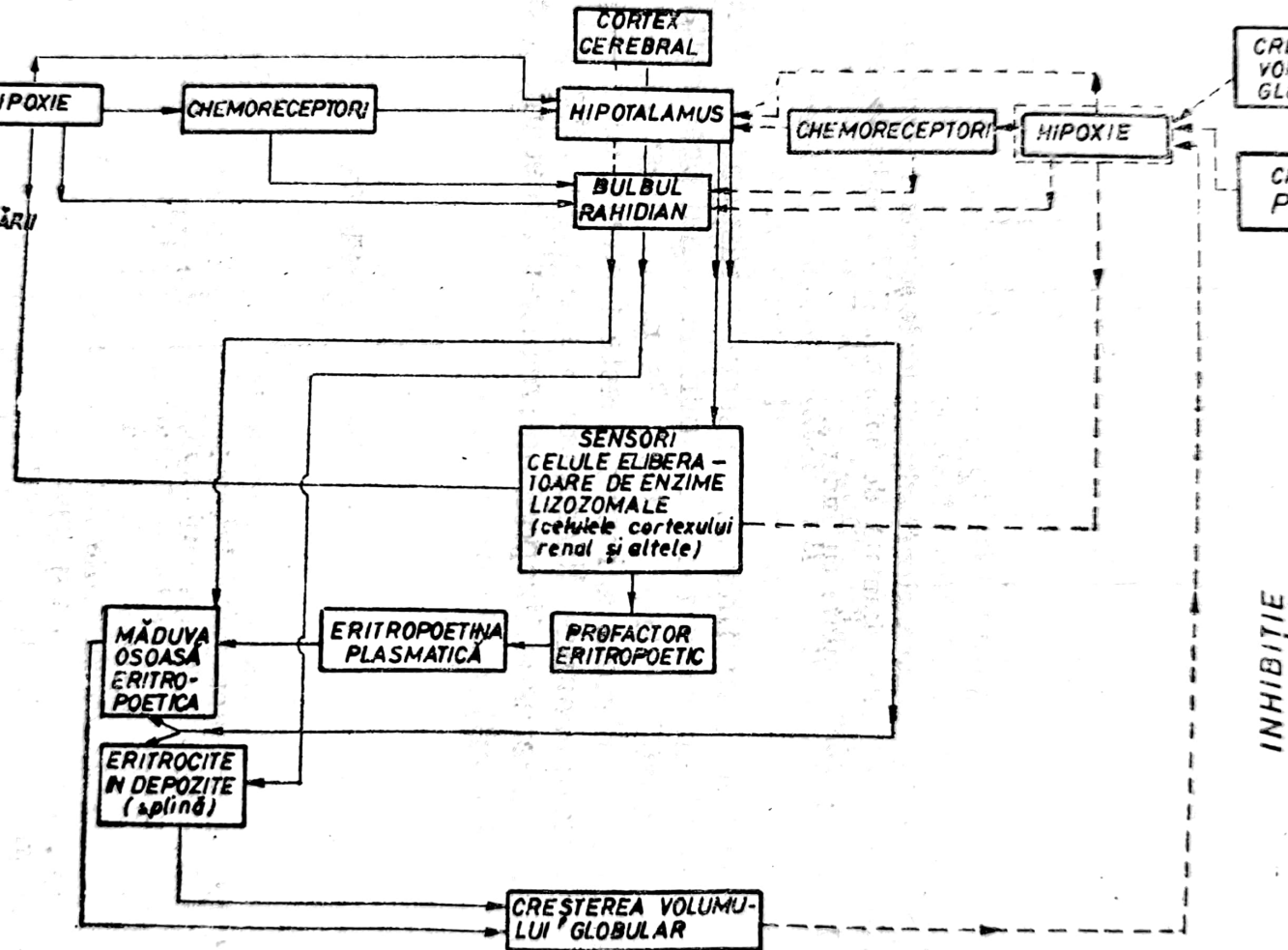


PARAMETRU CONTROLAT:
VOLUMUL GLOBULAR

FACTORI INHIBITORI:



STIMULARE



INHIBIȚIE

Fig. 64. Schema cibernetică a reglării eritropoezei.

lular și umoral. De fapt E r s l e v și colab. (1964), prin perfuzia unui preparat rinichi-plămîn-cord artificial, au putut evidenția activitate eritropoetică în lichidul de perfuzie hipoxic numai cînd în parenchimul renal erau evidențiabile necroze celulare. Mai mult, recent Libbin (1974), B a c i u, I v a n o f și colab. (1978) au demonstrat rolul eritrogenetic al enzimelor lizozomale.

Aceste fapte ne îndreptătesc să presupunem că la o hipoxie moderată, reacția simpatică beta-adrenergică declanșată prompt determină biogeneza și eliberarea eritropoetinei, nu numai renale ci și din teritorii extrarenale. La o hipoxie mai avansată, formarea eritropoetinei se realizează prin mecanismul acțiunii directe celulare a hipoxiei.

F i n k și F i s h e r (1977), bazați pe terminologia propusă de E r s l e v (1975), explică dubla reglare a producerii eritropoetinei prin existența unei faze de programare a secreției de eritropoetină, în care se eliberează cantități mici de hormon de către sistemul generator renal, urmată de o fază de sinteză, determinată de activarea sintezei proteice. F i n k și F i s h e r (1976) susțin că faza de programare este parțial dependentă de creșterea activității simpaticului.

Dacă cele două explicații sînt identice în mare măsură — ele —, diferă totuși în ideea că faza de programare nu este exclusiv renală, întrucît apare și la cîinii cu autotransplant renal, deci cu rinichiul denervat, după provocarea hipoxiei cefalice (B a c i u și colab., 1963).

Mecanismul prin care acționează simpaticul beta-adrenergic în activarea eritropoezei nu este încă elucidat. Implicațiile clinice la fel nu au fost încă investigate.

Cercetările expuse în monografia de față permit completarea modelului schematic al controlului de eritropoetină (propus de F i s h e r, 1969) cu un model mai complex de reglare a eritropoezei (fig. 64).

REGLAREA ERITROPOEZEI LA FĂT ȘI NOU-NĂSCUT

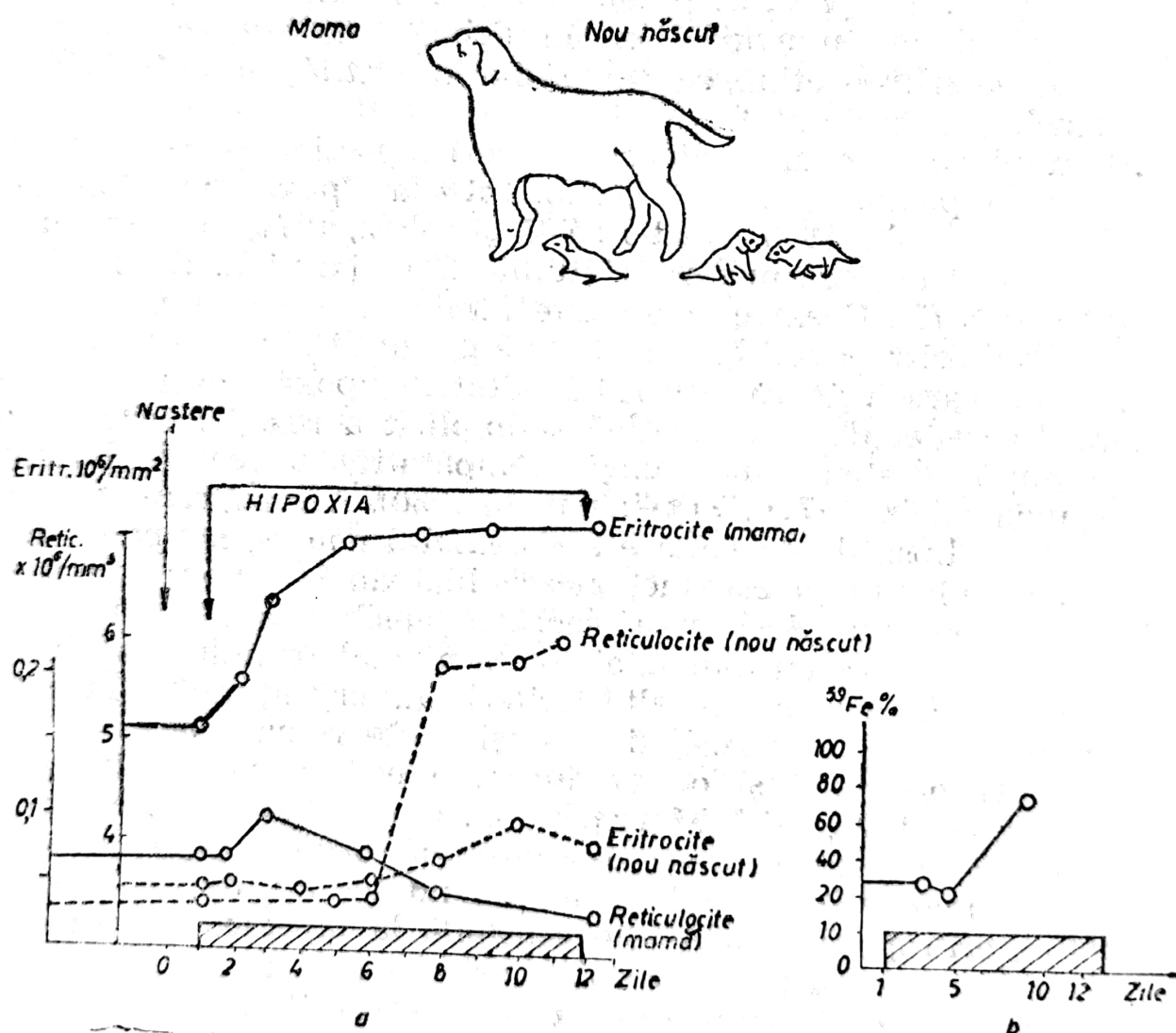
În organismul adult, sistemul nervos central și senzorii sensibili la modificările P_{O_2} sînt complet dezvoltati ceea ce asigură un răspuns prompt la modificările P_{O_2} tisular. La făt, reglarea nervoasă fiind exclusă prin lipsa de dezvoltare sau de desăvîrșire a structurilor nervoase, eritropoeza posedă mecanisme particulare de reglare.

Actual este unanim acceptată reglarea eritropoezei fetale prin eritropoetină, la fel ca și la adult. Astfel, eritropoetina a putut fi evidențiată în sângele cordonului ombilical, în lichidul amniotic și în urina copiilor normali și prematuri (Finne P. H., 1964, 1967). Prin administrarea serului antieritropoetină se produce o blocare a eritropoezei fetale (Schooly J. C. și colab., 1968). Anemia intrapartum, provocată la feții de oaie și capră, determină o creștere a secreției de eritropoetină în sângele acestora (Zanjani E. D. și colab., 1968, 1971, 1974). Policitemia, realizată intrapartum la acești feți prin hipertransfuzare, blochează eritropoeza acestora (Zanjani și colab., 1974). Dependența eritropoetinei fetale de eritropoetină a fost demonstrată și prin faptul că eritropoeza, blocată prin hipertransfuzarea feților, este reactivată de administrarea eritropoetinei exogene (Zanjani E. D. și colab., 1974). Este greu de precizat în stadiul actual al cercetărilor momentul dezvoltării ontogenetice în care eritropoeza fetală devine dependentă de eritropoetină. În timp ce unii autori (Cole R. J. și colab., 1966) nu reușesc să dovedească efectele eritropoetinei asupra eritropoezei în stadiul vitelin, alți autori (Malpoix P. 1967) găsesc activarea sintezei hemoglobinei și acidului ribonucleic sub acțiunea eritropoetinei în culturi pe embrioni de pui. Eritropoetina are însă un efect incontestabil asupra eritropoezei fetale în stadiul hepatosplenic. Eritropoeza hepatică este foarte sensibilă la eritropoetina exogenă într-un prim stadiu, pentru ca odată cu dezvoltarea secreției endogene de eritropoetină, prin dezvoltarea ficatului fetal, eritropoeza hepatică să devină insensi-

bilă la eritropoetina exogenă (Malpoix P. 1967; Zanjani E. D. 1974). Din aceste observații, autorii citați apreciază că secreția de eritropoetină se produce odată cu maturizarea ficatului fetal responsabil de secreția eritropoetinei în cursul vieții intrauterine. Nefrectomia intrauterină a feților (Zanjani E. D. și colab., 1974) sau a animalelor nou-născute (Carmena A. O. și colab., 1968, Lucarelli G. și colab., 1968) nu suprimă secreția de eritropoetină endogenă. Nici splenectomia intrauterină a feților nu împiedică secreția de eritropoetină (Zanjani E. D. și colab., 1974). Hepatectomia fetală, în proporție de 83%, suprimă complet producerea de eritropoetină (Zanjani E. D. și colab., 1974). Dovada experimentală că ficatul este răspunzător de secreția de eritropoetină a fost adusă de perfuzarea *in vitro* a rinichiului, splinei și ficatului de la feți anemizați (Zanjani E. D. și colab., 1974). În timp ce perfuzia rinichiului și splinei nu evidențiază în lichidul de perfuzie cantități decelabile de eritropoetină, ea este găsită în cantități mari în lichidul de perfuzie a ficatului.

Stimulul specific al producerii de eritropoetină la făt, este ca și la adult, hipoxia. Fătul este sensibil, atât la hipoxia mamei (Kaiser S. M. și colab., 1958, Matoth Y. și colab., 1971, Olteanu A. 1980) cât și la hipoxia numai a fătului (Zanjani E. D. și colab., 1968, 1974, 1977). Ceea ce deosebește fătul și nou-născutul de adult în răspunsul eritropoezei la hipoxie este promptitudinea acestei reacții, atât de caracteristică perioadei adulte. Hipoxia determină stimularea secreției de eritropoetină și implicit a reacției eritrocitare numai după o latență mai lungă, comparativ cu cea a adultului (Baciu și colab., 1971) (Olteanu A. 1980). Această caracteristică este dată de lipsa de dezvoltare a sistemului nervos, iar pe de altă parte și de nivelul la care acționează hipoxia în organismul fetal și al nou-născutului. Se pare că senzorii sensibili la deficitul de O_2 sînt localizați în organismul fetal tot la nivelul ficatului, involuind pe măsură ce se dezvoltă în alte teritorii ale organismului. În anumite condiții, în ontogeneză, ficatul își poate relua funcția de secreție a eritropoetinei și de producere a eritrocitelor (Mirand E. A. și colab., 1971, 1977, Murphy G. P. și colab., 1969, Nakao K. și colab., 1966). În toate aceste cazuri, eritropoeza răspunde la un nivel mult mai avansat la hipoxie nefiind blocată de policitemie. Faptul că eritropoeza fetală este sensibilă la hipoxie, dar nu este blocată de policitemie, ne face să considerăm că reluarea funcției eritropoetice a ficatului nu este integrală, senzorii celulari sensibili la deficitul de O_2 din ficat, existenți la făt, își pierd funcția în perioada adultă, când ei sînt dezvoltați la alte nivele (sistem nervos central, vase sanguine, rinichi etc.).

Mecanismele de reglare de tip fetal persistă un timp și după naștere pînă cînd, odată cu intrarea în funcție a mecanismelor nervoase de reglare și producerea integrală de eritrocite în măduva osoasă, se trece în mod gradat la un mecanism de tip adult, cel al reglării nervoase. Această tranziție se realizează în primele luni ale vieții extrauterine. Ceea ce caracterizează această perioadă este o depresie accentuată a eritropoezei, manifestată prin „anemia fiziologică” a nou-născutului. Mecanismele de reglare ale eritropoezei la nou-născut rămîn imature pe întreg parcursul acestei perioade și se caracterizează prin răspunsul întîrziat (fig. 65 a și b) al secreției de eritropoetină și al reacției eritrocitare (Baciu și colab., 1971).



Fătul prezintă astfel un mecanism independent de mamă al reglării eritropoezei, fără a fi însă excluse și posibilitățile de influențare de către eritropoetina maternă, care traversează placenta (fig. 66) într-un singur sens de la mamă la făt (Baciu și colab., 1971, A. Olteanu 1980).

Trecerea la tipul adult de reglare a eritropoezei se realizează pe măsură ce structurile nervoase vegetative superioare și chemoceptive, responsabile de reglarea eritropoezei se maturizează, prin dezvoltarea eritropoezei medulare și a mecanismelor adulte de secreție a eritropoetinei. În această perioadă de tranziție animalele răspund la stimulul hipoxic cu un timp de latență dublu, în comparație cu cele adulte (Baciu și colab., 1971). Din acest punct de vedere, reacția la hipoxie se aseamănă cu a animalelor adulte cu măduva spinării secționată (Baciu, 1964) sau cu leziuni ale zonelor vegetative centrale (Baciu 1967, 1968). Lezarea stereotaxică a hipotalamusului anterior și ventromedian în prima zi de viață extrauterină face ca reacția la hipoxie să aibă un caracter întârziat în tot cursul vieții, la fel ca și la animalul nou-născut (Olteanu 1980). În această perioadă nu sînt dezvoltate întru totul nici mecanismele chemoceptive respiratorii, circulatorii și de citodiabază ale reacției la hipoxie localizate în zonele sinocarotidiene și responsabile de această reacție la adult (Baciu și colab., 1960). Importanța dezvoltării structurilor nervoase în reglarea eritropoezei neonatale rezultă și din experiențele făcute pe două specii de animale care prezintă la naștere nivele diferite de dezvoltare (G. Lu-

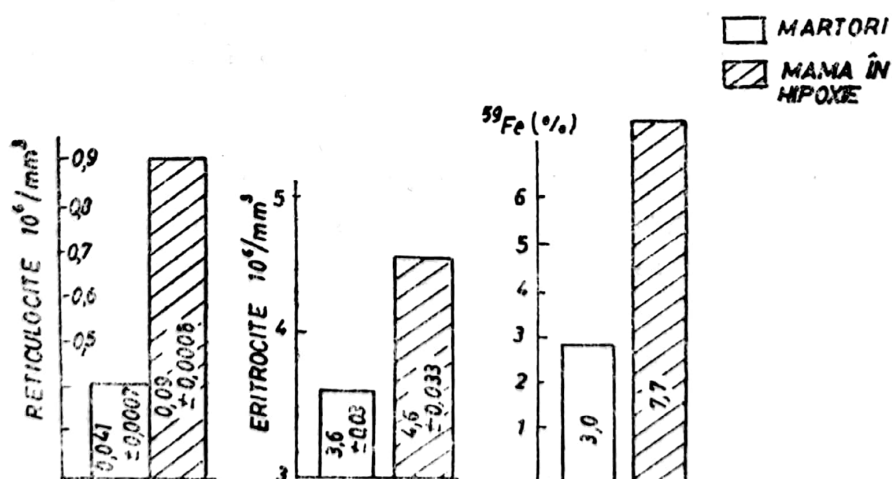


Fig. 66. Reprezentarea comparativă a valorilor eritrocitelor, reticulocitelor și eritropoetinei (testată prin incorporarea ^{59}Fe) la căței în prima zi de la naștere, proveniți 1) de la o mamă menținută la presiunea atmosferică normală; 2) și de la o mamă căreia timp de 5 zile antepartum i s-a provocat hipoxie cefalică.

carelli și colab., 1968). Șobolanul imatur la naștere, cu o dezvoltare minimă a sistemului nervos și cu o eritropoeză hepatosplenică, prezintă o reglare a eritropoezei de tip fetal și care trece gradat abia în prima lună de viață extrauterină la reglarea de tip adult. În aceeași perioadă de viață, cobaiul, care prezintă o gestație incomparabil mai mare (90 zile comparativ cu 21 zile la șobolani), se prezintă în momentul nașterii total dezvoltat, atât din punct de vedere al sistemului nervos cât și al eritropoezei. La acest animal, eritropoeza reacționează asemănător cu a adultului, deci încă la naștere reglarea este de tip adult. La om, gradul de imaturitate pe care îl observăm la șobolan la naștere, se întâlnește în perioada intrauterină, aproximativ în luna a VII-a de gestație. La naștere, fătul uman, fără a atinge un grad de maturitate perfect, prezintă totuși un nivel al sistemelor de reglare al eritropoezei, apropiat de tipul adult. Tranziția la controlul nervos al mecanismelor de reglare a eritropoezei la om este de scurtă durată în perioada neonatală.

MODEL MATEMATIC AL HOMEOSTAZIEI OXIGENULUI

SCHEMA CIBERNETICĂ INTEGRATIVĂ

Homeostazia oxigenului la ființele superior organizate comportă un ansamblu de procese, cum sînt: aportul, transportul, menținerea constanței tisulare a O_2 și eliminarea produșilor de metabolism, CO_2 , H^+ , H_2O .

Datorită complexității mecanismelor acestor procese, nu s-a putut elabora, pînă în prezent, un model cibernetic satisfăcător al homeostaziei oxigenului, diversele modele propuse în literatura de specialitate suferind, fie printr-un schematism exagerat, fie prin unghiul relativ îngust, sub care abordează problema.

Încercînd să remediem neajunsurile semnalate, am elaborat (Baciu, Aramă, 1974, 1977, 1978), pe baza rezultatelor clasice și a unor cercetări originale, o schemă cibernetică integrativă a ansamblului de procese pe care le comportă homeostazia oxigenului (fig. 67), incluzînd aici atît aspectele referitoare la funcțiile de respirație și de circulație, cît și acelea referitoare la reglarea și controlul eritropoezei. Schema elaborată a constituit o primă fază în abordarea matematică a problemei, rezultatele succesive obținute în această direcție constituind obiectul lucrărilor citate. Unificarea rezultatelor respective, într-o expunere sistematică și relativ completă, este în curs de apariție (Baciu, Aramă, 1980).

PARAMETRII SISTEMULUI

O primă grupă de parametrii care intervin în cadrul schemei adoptate o constituie *parametrii principali*. Se numesc astfel, deoarece ei determină, în ultimă instanță, prin valorile pe care le iau, starea sistemului.

SCHEMA CIBERNETICĂ INTEGRATIVĂ A HOMEOSTAZIEI OXIGENULUI

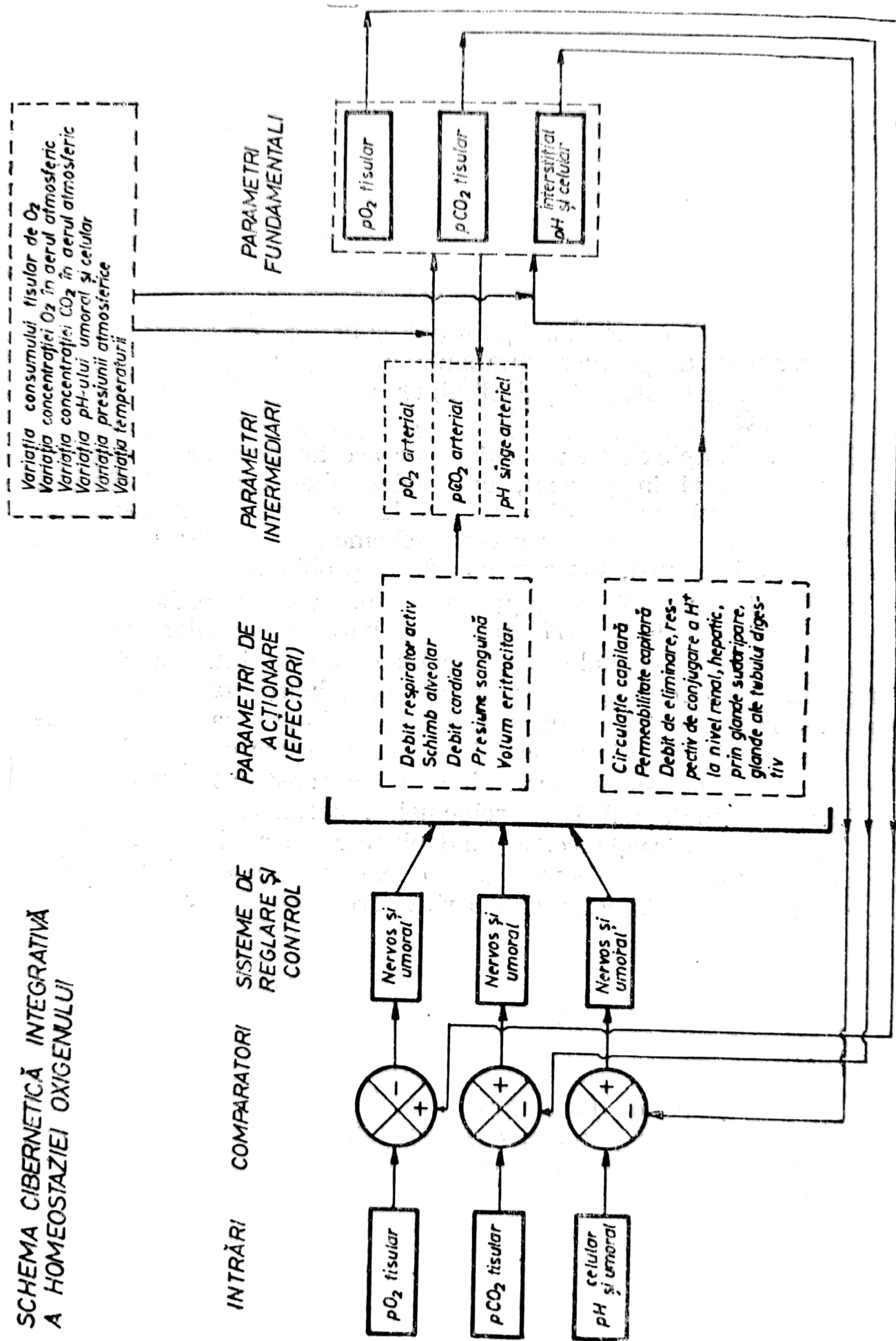


Fig. 67. Schema cibernetică integrativă a ansamblului de procese pe care le comportă homeostazia oxigenului.

În cadrul sistemului homeostaziei oxigenului, parametri principali sînt P_{O_2} tisular, P_{CO_2} tisular și pH interstițial și celular.

Mentținerea parametrilor fundamentali și a celor intermediari la valori constante (normale) se realizează în cadrul sistemului, prin funcțiile de respirație, circulație, ale eritronului, precum și prin cele de excreție (rinichi, ficat, glande sudoripare, glande ale tubului digestiv). Parametrii prin care se manifestă aceste funcții de reglare constituie *parametrii de acționare* (sau efectori).

În cazul sistemului homeostaziei oxigenului, se pot considera ca parametri efectori, următorii: debitul respirator activ, schimbul alveolar (caracterizat prin suprafața și grosimea membranei alveolo-capilare), debitul cardiac, presiunea sanguină, circulația capilară, permeabilitatea capilară, volumul eritrocitar total, capacitatea de tamponare și debitul de eliminare, respectiv de conjugare a ionilor de H^+ , pe cale renală, la nivel hepatic, prin glandele sudoripare și glande ale tubului digestiv.

Acești parametri acționează asupra parametrilor principali fie în mod direct, fie în mod indirect, prin *parametrii intermediari*, depinzînd de cei efectori și strîns corelați cu cei fundamentali.

Este cazul următorilor parametri: P_{O_2} și P_{CO_2} arterial, pH-ul sîngelui arterial (în circulația sistemică).

După cum o arată cercetările de specialitate, valorile parametrilor intermediari sînt de asemenea menținute în limite strînse, depinzînd de valorile (normale) ale parametrilor fundamentali, reglarea lor efectuîndu-se prin sisteme de natura celor care intervin în reglarea parametrilor fundamentali.

Factorii perturbatori luați în considerare în cadrul modelului sînt variația consumului tisular de O_2 , variația concentrației O_2 , respectiv CO_2 în aerul atmosferic, variația pH-ului umoral și celular, variația presiunii atmosferice, variația temperaturii.

INTERPRETAREA SISTEMULUI CA ANSAMBLU DE SUBSISTEME

Construcția modelului matematic se bazează pe o interpretare a organismului ca un sistem complex în echilibru dinamic format în principal din două sisteme multicompartimentale deschise, conectate între ele prin relații funcționale.

Primul subsistem reprezintă de fapt aparatul respirator și circulator, concepute într-un cadru funcțional unitar. În alcătuirea

SISTEMELE RESPIRATOR ȘI CIRCULATOR ALE HOMEOSTAZIEI OXIGENULUI

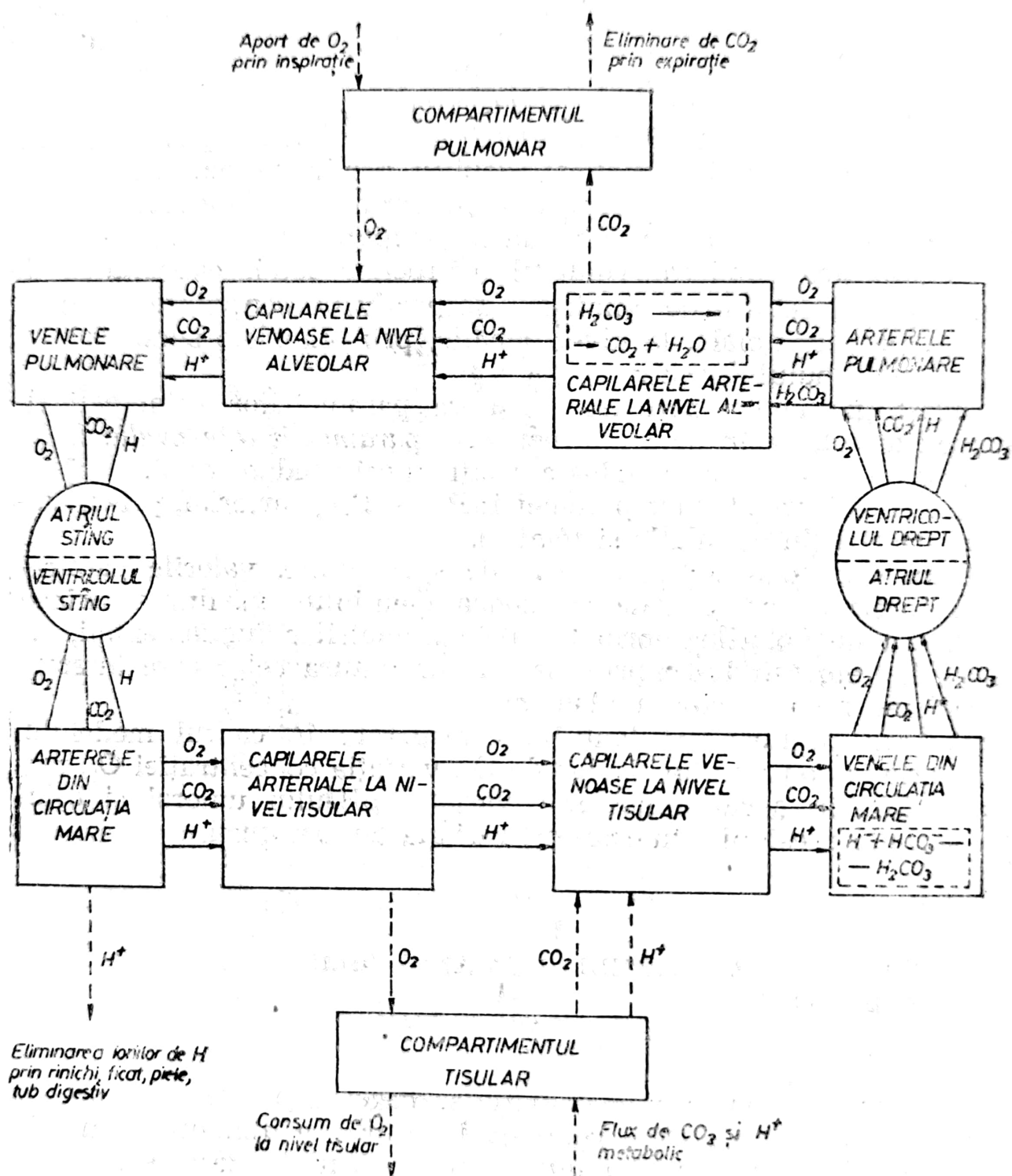


Fig. 68. Alcătuirea subsistemului compartimental conținând aparatul respirator și circulator, concepute într-un cadru funcțional unitar.

ERITRONUL INTERPRETAT CA SUBSISTEM DINAMIC
BICOMPARTIMENTAT AL SISTEMULUI HOMEOSTAZIEI
OXIGENULUI

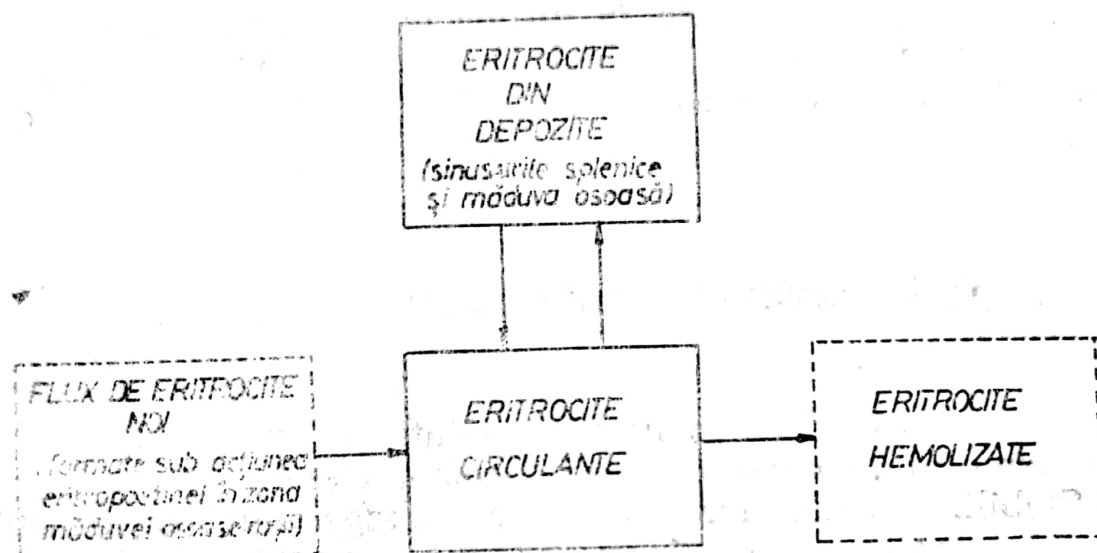


Fig. 69. Eritronul, subsistem dinamic bicompartimentat al sistemului homeostaziei oxigenului.

acestui subsistem propunem 10 compartimente considerate cele mai importante reprezentate schematic în fig. 68. Între aceste compartimente au loc schimburi de O_2 și CO_2 , caracterizate prin ratele corespunzătoare.

Al doilea subsistem, anume subsistemul eritrocitar (eritronul) este interpretat ca un sistem, dinamic bicompartimentat (fig. 69). Compartimentul funcțional îl reprezintă eritrocitele circulante (din sânge). Acestea se află sub acțiunea a trei fluxuri continue, reprezentând procesul de lansare în sânge a eritrocitelor din depozite, procesul de lansare în sânge a unor eritrocite noi, generate în zona măduvei osoase hematoformatoare, sub acțiunea eritropoetinei, procesul de eliminare a eritrocitelor uzate (prin hemoliză).

În strînsă conexiune cu compartimentul funcțional al eritrocitelor circulante se află cel de al doilea compartiment, reprezentînd rezerva eritocitară din sinusurile splenice și din măduva osoasă.

Împărțirea sistemului homeostaziei oxigenului în cele două subsisteme nu are un caracter absolut, subsistemul eritrocitar intervenind în mod esențial în funcționarea primului sistem, iar acesta, în reglarea sistemului eritrocitar.

Referitor la ultimul aspect, conform unor reprezentări unanim admise, concentrația eritrocitelor în sânge este determinată, în prin-

cipal, de următorii parametri: cantitatea de eritrocite care pătrund din, respectiv în depozite eritrocitare, cantitatea de eritrocite noi, formate în zona măduvei osoase roșii, sub acțiunea eritropoetinei, cantitatea de eritrocite hemolizate (fig. 66). Reglarea fluxurilor de eritrocite care acționează asupra compartimentului circulant se efectuează pe cale nervoasă și endocrină, prin mecanisme complexe, care, la rîndul lor, sînt declanșate, în ultimă instanță, de nivelele pe care le iau parametri (factorii) principali și intermediari ai sistemului homeostazic, adică de P_{O_2} , P_{CO_2} , tisular și arterial și pH celular și umoral.

ECUAȚIILE SISTEMULUI HOMEOSTAZIC

După cum s-a arătat în lucrările citate anterior, stabilirea ecuațiilor sistemului a comportat următoarele etape:

1. Stabilirea ecuațiilor continuității oxigenului, bioxidului de carbon și a ionilor de H^+ în fiecare din compartimentele subsistemului 1, respectiv a ecuațiilor continuității eritrocitelor în compartimentele subsistemului 2 (eritrocitar). Aceste ecuații exprimă faptul că variația (în unitate de timp) a cantităților de O_2 , CO_2 , respectiv de eritrocite, în fiecare din compartimentele menționate este egală cu suma cantităților care intră în compartiment, minus suma cantităților care ies din compartiment, cantitățile respective fiind consecința fluxurilor care acționează asupra acestuia.

2. Stabilirea expresiilor analitice ale acestor fluxuri în funcție de nivelele parametrilor de acționare (efectorilor).

3. Stabilirea ecuațiilor dispozitivelor de reglare a parametrilor de acționare, în funcție de nivelele parametrilor fundamentali și intermediari, care caracterizează în ultimă instanță starea sistemului homeostazic.

Prin rezolvarea (integrarea) ansamblului de ecuații astfel obținute se obțin expresii analitice explicite ale funcțiilor, care descriu comportarea sistemului homeostazic, în prezența factorilor perturbatori menționați.

De asemenea, pe baza sistemului de ecuații care descriu funcționarea sistemului homeostazic, în ansamblul său, devine posibilă modelarea funcționării acestuia cu ajutorul calculatoarelor.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- ADAMSON, J. W., *The erythropoietin (hematocrit relationship in normal and polycythemic man: Implications of marrow regulation*, Blood, 1968, 32, 597—609
- ADAMSON, J. W., ALEXANIAN, R., MARTINEZ, C., FINCH, C. A., *Erythropoietin excretion in normal man*, Blood, 1966, 28, 349—353.
- ADAMSON, J. W., FINCH, C. A., *Erythropoietin and the polycythemias*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968, 149, 560—563.
- ALEXANIAN, R., *Erythropoietin and erythropoiesis in anemic man following androgens*, Blood, 1969, 33, 564—572
- ASHBY, W. R., *Design for a brain*, London, Ed. Chapman, 1960
- BACIU, I., *Despre stimularea eritropoezei prin hipoxie*, Stud. cercet. med. (Cluj), 1957, 8, 3—4, 255—260
- BACIU, I., *La régulation nerveuse et humorale de l'érythropoïèse*, J. Physiol. (Paris), 1962, 54, 441—458.
- BACIU, I., *Reglarea neuro-umorală a eritropoezei*, Stud. cercet. med. (Cluj), 1963, 14, 23—42
- BACIU, I., *Système nerveux et mécanismes humoraux dans la régulation de l'érythropoïèse*, Rév. Roum. Physiol., 1964, 1, 149—160
- BACIU, I., *Sur le rôle de l'hypothalamus et de la formation réticulée bulbaire dans la régulation de l'érythropoïèse*, Rév. Roum. Physiol., 1967, 4, 251—260
- BACIU, I., *Conceptia actuală asupra reglării neuro-umorale a eritropoezei*, Doc. Haematologica, 1967, 15, 15—37
- BACIU, I., *Le contrôle nerveux et humoral de l'érythropoïèse*, Symposio intern, sui fattori della eritropoiesi, Pavia, 1967, Ed. Italseber, 1968
- BACIU, I., *Fiziologia eritropoezei*, Clujul medical, 1968, 41, 407—418
- BACIU, I., *Einfluss der Hirnhypoxie auf Kreislauf und Erythropoese. Beiträge zur Problemen der Hypoxie und der mathematische Modellierung* (sub. red. P. Linke Ed. J. A. Barth), Leipzig, 1970, 85—101
- BACIU, I., *Die humorale und nervöse Regelung der Erythropoese*, Klin. Wsch., 1970, 48, 133—134
- BACIU, I., *Kontrollmechanismen während der Anpassung an Hypoxie. Ergebnisse der experimentellen Medizin*, 1974, 15, 195—205
- BACIU, I., *La régulation de l'érythropoïèse*, Arch. de l'Union Médicale Balkanique, 1977, 15, 12—17
- BACIU, I., *Renal mechanism in erythropoiesis regulation*, Rev. roum. Morphol. Embryol. Physiologie, 1979, 16, 9—17.

- BACIU, I., ARAMA, O., *Model matematic al homeostaziei oxigenului* (I). Al II-lea Simpozion cu tema „Hipoxia”, Cluj-Napoca, 12 decembrie 1974.
- BACIU, I., ARAMĂ, O., *Model matematic al homeostaziei oxigenului* (II). Al III-lea Simpozion de informatică și conducere. Sisteme cibernetice și informatică medicală, Satu-Mare, 16—18 mai 1977
- BACIU, I., ARAMĂ, O., *Model matematic al homeostaziei oxigenului* (III). Al II-lea Simpozion de informatică medicală, Oradea, 15—17 mai 1978, Caietul lucrărilor, 144
- BACIU, I., DEREVENCO, P., PAVEL, T., *Einfluss von Erythropoetin, auf die Durchblutung des Knochenmarks*, Acta Biol. med. germ., 1973, 31, 389—392.
- BACIU, I., DEREVENCO, P., SOVREA, I., PERENI, N., POPA, V., *Semnificația răspunsului simpato-adrenal la hipoxie în raport cu reacția eritrocitară*, Fiziol. norm. patol., 1969, 15, 491—498
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., OLTEANU, A., PAVEL, T., *Die Erythropoetinssekretion während der Postnatalenentwicklung*, Rev. Roum. Physiol., 1971, 8, 37—45
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., OLTEANU, A., PAVEL, T., DANIELLO, A., *Biogeneza eritropoetinei*, Nota II, *Mecanisme enzimatice extrarenale*, Fiziol. norm. patol. 1973, 19, 127—136.
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., OLTEANU, A., VASILE, V., *Purification and immunogenic quality of blood erythropoietin*. Symposium on the physiology of the Hemopoietic system, Abstracts, Olsztyn, Poland, 12—14 Sept., 1968, p. 4
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., OLTEANU, A., VASILE, V., *Proprietățile antigenice ale eritropoetinei (Tipuri de anticorpi generați de eritropoetină)*, Fiziol. norm. patol. 1971, 17, 203—213
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., ROSENFELD, E., *Sur le lieu formation de l'érythropoïétine*. XXIX Congress of the Hungarian Society of Physiology Szeged 1—2 and 3 July, 1965, 201.
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., ROSENFELD, E., DON, F., RĂDUCANU, N., TIMAR, N. *Sur le lieu de formation des l'érythropoïétine*, J. Physiol., (Paris), 1970, 62, 231—243
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., RUSU, M., TOMUS, L., *Stimularea eritropoezei prin hipoxie. Despre acțiunea directă și reflexă a hipoxiei în reglarea nervoasă și umorală a eritropoezei*, Stud. cercet. med. (Cluj), 1960, 11, 239—251
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., TOMUS, L., SOLTUZ, V., DEREVENCO, P., *Influența hipoxiei asupra activității electrice corticale și excitabilității chemoceptorilor sino-carotidieni în condiții diferite de difuziune a oxigenului* Stud. cercet. med. (Cluj), 1963, 15, 115—129
- BACIU, I., DOROFTEIU, M., TOMUS, L., SOLTUZ, V., RUSU, M., *Stimulation nerveuse de l'érythropoïèse par l'hypoxie*. Congr. XXII. Intern. de Physiol., Leyden, 1962, 2, 345
- BACIU, I., GOZARIU, L., RĂDUCANU, N., STOICA, N., *Cercetări experimentale privind rolul complexului epitalamo-epifizar în eritropoeză*, Fiziol. norm. patol., 1968, 10, 109—118
- BACIU, I., IVANOF, LIANA, *Activitatea esterazică și acidul neuraminic seric în cursul hipoxiei la șobolan*, Clujul medical, 1975, 48, 215—220
- BACIU, I., IVANOF, LIANA, *Efectul eritropoetinei asupra metabolismului eritrocitelor de șobolan*, Comunicare USSM, 1979.
- BACIU, I., IVANOF, LIANA, MUREȘAN, A., PAVEL, T., *Influența eritropoetinei asupra absorbției de riboză de către celulele măduvei osoase*, Clujul medical, 1977, 50, 266—272

- BACIU, I., IVANOF, LIANA, MUREȘAN, ADRIANA, PAVEL, T., BENGĂ G., *Efectul hipoxiei hipobare asupra lizozimilor renali de șobolan*, Clujul medical, 1978, LI, 247—254.
- BACIU, I., IVANOF, LIANA, PAVEL, T., *Efectul eritropoetinei asupra metabolismului eritrocitelor de șobolan*, Clujul medical, 1980, 53, 47—54.
- BACIU, I., IVANOF, LIANA, PRODAN, TEREZIA, *Distribuția eritropoetinei între plasmă și eritrocite*. A XVIII-a Sesiune științifică a cadrelor didactice și studenților. Cluj-Napoca, 1979
- BACIU, I., NEUMANN, E., DOROFTEIU, M., PITEA, P., *Despre stimularea eritropoezei prin hipoxie*, Nota I, Fiziol. norm. patol., 1957, 4, 207—217
- BACIU, I., NEUMANN, E., DOROFTEIU, M., PITEA, P., *Despre mecanismul de stimulare a eritropoezei prin hipoxie*. Ses. științifică 1957, Cluj, 57—58.
- BACIU, I., OPRÎȘIU, C., DOROFTEIU, M., ROSENFELD, E., RUSU, M., CHEREBETIU, C., *Stimularea eritropoezei prin hipoxie (V). Rinichiul și secreția de eritropoetină*, Stud. cercet. med. (Cluj), 1963, 14, 265—284.
- BACIU, I., PAVEL, T., PRODAN, TEREZIA, DEAC, M., *Mecanismul acțiunii biologice a eritropoetinei*, Clujul medical, 1974, 2, 239—339.
- BACIU, I., PAVEL, T., VASILE, V., VITEBSKI, V., *Răspunsul șoarecilor iradiati la eritropoetină*. Polipeptide biologice active. (red. I. BACIU), Cluj, 1970, 37—47.
- BACIU, I., ROSENFELD, E., DOROFTEIU, M., RUSU, M., *Isolation et propriétés biologiques d'un facteur érythrostimulateur protéique*. XXI^e Congr. int. Sci. Physiol., Buenos-Aires, 1959, 25—26.
- BACIU, I., ROSENFELD, E., DOROFTEIU, M., RUSU, M., *Stimularea eritropoezei prin hipoxie*. Nota III. Izolarea și proprietățile biologice ale unui factor proteic de stimulare a eritropoezei. Stud. cercet. med. (Cluj), 1959, 10, 47—62.
- BACIU, I., ROSENFELD, E., DOROFTEIU, M., TELIA, M., *Acțiunea eritropoetinei în anemia experimentală fenilhidrazinică și de iradiere*, Stud. cercet. med. (Cluj), 1961, 12, 19—32.
- BACIU, I., ROSENFELD, E., DOROFTEIU, M., TELIA, M., CUPĂRESCU, E., *Acțiunea eritropoetinei în anemia experimentală fenilhidrazinică și de iradiere*. Stud. cercet. med. (Cluj), 1961, 12, 1—14.
- BACIU, I., ROSENFELD, E., HOLAN, T., SZANTAI, I., URAY, Z., *Volumul plasmatic și sanguin cu T 1824 și volumul globular cu ³²P la șobolanul neanesteziat*. Fiziologia, 1961, 4, 217—228.
- BACIU, I., SECĂREANU, ST., VASILE, V., POPA, Z., *Purificarea eritropoetinei prin precipitare cu metanol și cromatografiere*, Clujul medical, 1964, 3, 118.
- BACIU, I., STOICA, N., NATALIA, RĂDUCANU, *Participarea hipotalamusului și a formației reticulare bulbare în reglarea eritropoezei*. A IV-a Conferință națională de fiziologie, București, 4—6 oct., 1967, p. 113.
- BACIU, I., STOICA, N., RĂDUCANU, N., *Rolul hipotalamusului posterior în reglarea eritropoezei*, Stud. și cercet. de fiziol., 1968, 13, 1, 15—23.
- BACIU, I., ȘOLTUZ, V., STOICA, N., RĂDUCANU, NATALIA, *Sur les centres régulateurs de l'érythropoïèse*, Rév. Roum. Physiol, 1965, 2, 123.
- BACIU, I., TELIA M., DOROFTEIU, M., *Dinamica răspunsului medular la eritropoetină*, Fiziol. norm. patol., 1962, VIII, 4, 313—320.
- BAGDASAROV, A. A., RUTBERG, H. A., CERTKOV, I. L., ROZENBERG, G. I., ROVSENBAH, M. O., *Izucenie properdinovoi sistemî organisme. Problemî ghematologhii i perelivaniia krovi*, 1958, 2.
- BANGHAM, D. R., *Biological assay and a standard for erythropoietin*, în: *Erythropoiesis* (edited by L. O. Jacobson and M. Doyle), New-York, Grune, Stratton, 1962, 23.

- BARBASOVA, Z. I., GRIGOREVA, G. I., ERMILOVA, V. V., FOMINA, E. G., *S voprosu o vlianii nervnoi sistemî na gipocsicescii eritroitoz*, Fiziol. J. S.S.S.R., 1959, XLV, 7, 856—864.
- BACQ, Z. M., ALEXANDER, P., *Principes de radiobiologie*, Sciences et Lettres, Liège, 1954.
- BECKER, C. J., KREUTZER, F., *Sympathoadrenal response to hypoxia*, Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1968, 304, 1.
- BEER, A. G., BÖHM, K., *Untersuchungen über die Regulation des roten Blutbildes*, Verhandl. deutsch. Gessllsch. inn. Med., 1939 51, 399—404.
- BEER, A. G., *Über die nervös-humorale Regulation des Blutes*, Fol. Haemat. (Leipzig), 1942, 66, 222—298.
- BENETATO, Gr., *Principii generale și aspectele speciale ale homeostaziei*, Fiziol. norm. patol., 1964, 10, 1.
- BENETATO, G., BACIU, I., OPRIȘIU, C., VITEBSKI, V., *Efectul șocului electroconvulsivant asupra mobilizării anticorpilor și activării fagocitozei*, Bul. șt. Acad. RPR, sect. șt. med., 1954, 6, 509.
- BENETATO, G., BACIU, I., VLAD, L., *Sistemul nervos central și funcția de apărare. Rolul centrilor organo-vegetativi hipotalamici în activitatea fagocitară (Contribuțiuni experimentale)*, Ardealul medical, 1944, 4, 317.
- BENETATO, Gr., BACIU, I., VLAD, L., *Die Rolle der hypotalamischen vegetativen Zentren bei der Phagocitentätigkeit*, Schweizerische Med. Wochenschrift Jg, 1945, 75, 32, 702—704.
- BENETATO, Gr., OPRIȘIU, C., BACIU, I., *Rolul sistemului nervos central în declanșarea reacției fagocitare (Contribuțiuni experimentale făcute prin metoda „capului izolat“)*, Ardealul medical, 1946, VI, 7, 346—349.
- BENETATO, Gr., OPRIȘIU, C., BACIU, I., *Système nerveux central et phagocytose (Contributions expérimentales grâce à la méthode de la tête isolée)*, J. Physiol. (Paris), 1947, 39, 191—197.
- BERNARD CL., *Introducere în studiul medicinei experimentale*, Ed. Stat, București, 1958.
- BERNARD, CLAUDE, *Cahier de notes. 1850—1860*, Ed. Gallimard, 1965.
- BERT, P., *Sur la richesse en hémoglobine du sang des animaux vivant sur les hauts lieux*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 1882, 94, 805—807.
- BESSIS, M., *L'ilôt érythroblastique, unité fonctionnelle de la moelle osseuse*, Rev. hémat., 1958, 13, 8.
- BESSIS, M., *Erythropoiesis as seen with the electron microscope. The kinetics of cellular proliferation*, (Fr. Stohlman Jr. M. D. editor), Grune and Stratton, New-York & London, 1959, 22—30.
- BITMAN, E., *Cibernetică și biologie. Servomecanisme homeostazice*, Ed. științifică, București, 1974.
- BLACKETT, N. M., *The use of radioactive iron in studying the response of erythropoietic tissue to whole-body irradiation*, Proceeding of R. Panel, I.A.E.A., Vienna, 1967.
- BLACKET, N. M., ROYLANCE, P. J., *The recovery in erythropoiesis and erythropoietic capacity following whole body irradiation using ⁵⁹Fe and bone marrow transplantation*, Ed. Centre national de la Recherche Scientifique, Paris, 1956, 59—60.
- BOCK, H. E., NIETH, H., SOLTH, K., *Anämie bei Niereninsuffizienz*, Dtsch. Med. Wschr., 1962, 87, 12, 573—581.
- BOGOMOLET, A. A., *Medițin. Journ.*, 1935, V. 1, 5,; 1936, VI. 1, 29.
- BOIVIN, P., *Érythropoïétine*, Path. Biol, 1966, 14, 7—8, 489—512.
- BOLTON, A. E., HUNTER, W. M., *Biochem. J.*, 1973, 133, 529—539.

- BONSDORFF, E., JALAVISTO, E., *A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis*, Acta Physiol. Scandinav., 1948, 16, 150—169.
- BONSDORFF, E., *On the presence of erythropoietins in the plasma from sheep foetuses during the latter half of gestation*, Acta Physiol. Scand., 1949, 18, 51—62.
- BONSDORFF, E., SELESTE, E., *Artificially induced local anoxaemia in the treatment of children's anaemia*, Acta paediat., 1949, 37, 441—448.
- BONVALLET, M., HUGELIN, A., *Influence de la formation réticulaire et du cortex cerebral sur l'excitabilité motrice au cours de l'hypoxie*, Electroenceph. clin. Neurophysiol., 1961, 13, 270—284.
- BORBÉLY, T., *Reglarea nervoasă și umorală a eritropoezei*, Lucrare de diplomă, Universitatea „Babeș-Bolyai” 1964.
- BORSOOK, H., *On the mucoprotein erythropoietic factor. The kinetics of cellular proliferation*, Ed. Jr. Stohlman Fr. Grune—Stratton, New-York and London, 1959.
- BORSOOK, H., *A discussion of humoral erythropoietic factors*, Ann. New-York Acad. Sc., 1959, 77, 725.
- BORSOOK, H., ABRAMS, A., LOWY, P. H., *Fructose-amino acids in liver: Stimuli of aminoacid incorporation in vitro*, J. Biol. Chem., 1955, 215, 111—124.
- BOYCOTT, A. E., DOUGLAS, C. G., PRICE-JONES, C., *Haemopoietine*, J. Path. Bact. 1911, 15, 116—118.
- BORSOOK, H., GRAYBIEL, A., KEIGHLEY, G., WINDSOR, E., *Polycythemic response in normal adult rats to a nonprotein plasma extract from anemic rabbits*, Blood, 1954, 9, 7, 735—742.
- BONVALLET, M., MOREL, E., THIERY, G., *Modifications sanguines permanentes observées à la suite de lésions de l'hypothalamus antérieur, chez le chien*, C.R. Soc. Biol., 1951, 145, 381—385.
- BROWN, J. R., ALTSCHULER, N., COOPER, J. A. D., *Erythropoietic effect of red blood cell components and heme-related compounds*, Proceedings of the Society for experimental biology and medicine, 1963, 112, 840—843.
- BRUCE, W. R., Mc. CULLOCH, E. A., *The effect of erythropoietic stimulation on the hemopoietic colony forming cells of mice*, Blood, 1964, 23, 216.
- CANNON, W. B., *The window of the body*, New-York, Norton, 1939.
- CANTACUZÈNE, G., *Sur les variations quantitatives et qualitatives des globules rouges, provoquées chez le lapin par les injections du serum hémolytique*, Ann. Inst. Pasteur, 1900, XIV, 6, 378.
- CANTOR, L. M., ZANJANI, E. D., WOUG, K. K., GORDON, A. S., *The renal erythropoietic factor (REF) IX. Its subcellular distribution*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, 130, 950—952.
- CARMENA, A. O., HOWARD, D., STOHLMAN, F. Jr., *Regulation of erythropoiesis. XXV. Erythropoietin production in the new-born animal*, Blood, 1968, 32, 376.
- CARNOT, P., DEFLANDRE, Cl., *Sur l'activité hématopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang*, C. R. Acad. Sci. (Paris), 1906, 143, 384—386.
- CĂLUGĂREANU, D., HENRI, V., *Influence des variations rapides d'altitude sur la composition du sang*, C. R. Soc. Biol., 1901, 53, 1037.
- CERNIGOVSKI, V. N., IAROȘEVSKI, A. I., *Problemi nervnoi regulatii sistemî krovî v experimente i klinike*, Terap. Archiv, 1957, 29, 10, 69—84.
- CLARK, L. C., WOLF, R., GRAUGER, D. and TAYLOR, Z., *Continuous recording of blood oxygen tension by polarography* J. appl. Physiol., 1953, 6, 189.

- COLE, R. J., PAUL, J., *The effects of erythropoietin on haem synthesis in mouse yolk sac and cultured foetal liver cells*, J. Embr. Exp. Morph., 1966, 15, 245.
- COMROE, J. H. Jr., *The peripheral chemoreceptors. Handbook of Physiology*, sect. 3: *Respiration*, American Physiological Society, Washington, D. C., 1964, 1, 557—585.
- COMROE, J. H., *Physiologie de la respiration*, Masson, Paris, New-York, Barcelona, Milan, 1978.
- CONTRERA, J. F., GORDON, A. S., *Erythropoietin. Production by a particulate fraction of rat kidney*, Science, 1966, 152, 653.
- CONTRERA, J. F., GORDON, A. S., WEINTRAUB, A. H., *Extraction of an erythropoietin-producing factor from a particulate fraction of rat kidney*, Blood, 1966, 28, 330—343.
- COTES, P. M., *Methods in investigative and diagnostic endocrinology*, Part III, *Non-pituitary hormones* (S. A. Berson, R. W. Jalow eds), North-Holland, Amsterdam, 1973, 1117—1123.
- COTES, P. M., BANGHAM, D. R., *Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at a reduced pressure*, Nature, 1961, 191, 1065—1067.
- COTES, P. M., BANGHAM, D. R., *The international reference preparation of erythropoietin*, Bull. W. H. O., 1966, 35, 751—760.
- CRAFTS, R. C., MEINEKE, H. A., *Presence of erythropoietic factor in plasma of normal and hypophysectomized rats following bleeding*, Proc. Soc. Exp. Biol. a Med., 1956, 92, 222—224.
- CROWELL, J. W., *Cardiac deterioration as the cause of irreversibility in shock*, in: Mills, L. J., Mayer, J. H. (redaction), *Shock and hypotension pathogenesis and treatment*, Grune Stratton, 1965, 26, 605.
- CROWELL, JACK, W., *Oxygen transport in the hypotensive state*, Federation proceedings, 1970, 29, 1848—1853.
- Mc CULLOCH, C. O., TILL, S. E., *The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow transplantation into irradiated mice*, Rad. Resh., 1960, 13, 115.
- DANIELOPOLU, D., *Principiile de bază ale farmocodinamiei, nespecifice. Rolul sist. nerv.*, Studii cerc. neur., Acad. R.P.R., 1950, 1, 29—37.
- DANIELLO, R., *Rolul rinichiului în reglarea eritropoezei*, Teză de doctorat, Cluj, 1971.
- DANIELLO, R., BACIU, I., ROSENFELD, E., PAVEL, T., *Biogenèse de l'érythropoïétine. I. Effet du blocage du SRE sur l'elaboration de l'érythropoïétine*, Rev. Roum. Physiol., 1971, 8, 597—608.
- DANIELOPOLU, D., POPESCU, M., *Essais de classification des différentes catégories d'organes suivant leur mécanisme de regulation végétative*, Bull. a l'Acad. de Méd. de Roum, 1946, 18, 1—3, 69—76.
- DAVIS, J. E., *Erythropoietic stimulating activity of acetylcholinesterase*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 104, 698—699.
- De GOWIN, R. L., *Inhibition of erythropoiesis during stem cell proliferation*, Clin. Res., 1967, 15, 275.
- De GOWIN, R. L., *Effect of erythropoietin on the recovery of erythropoiesis after partial-body irradiation*, J. Lab. Clin. Med., 1967, 70, 869.
- De GOWIN, R. L., HOFSTRA, D., GURNEY, C. W., *A comparison of erthropoietin bioassays*, Proc. Soc. exp. Biol., 1962, 110, 48—51; *Berichte*, 1963, 244. 3.
- De GOWIN, R. L., JOHNSON, S., *Effect of endogenous erythropoietin on replicating hemopoietic stem cells (32471)*, Proc. of the Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 126, 442—446.

- De GROOT, *The rat forebrain in stereotaxic coordinates*, Verhandlungen der koninklijke nederlandse Akademie van Wetenschappen, afd. Naturkunde tweede Feeks, 1959, 52, 4.
- DOROFTEIU, MIRCEA, *Reglarea umorală a eritropoezei*, Teză de doctorat, IMF Cluj, 1969.
- DOROFTEIU, M., OLTEANU, A., PAVEL, T., *Cercetări asupra factorului inhibitor al eritropoezei. Polipeptide endogene biologice active*. Lucrări simpozion 22 nov. 1968, 1970, 49—61.
- DOROFTEIU, M., OLTEANU, A., PAVEL, T., MAGDALENA, BANEA, *Mecanisme de secreție a factorului inhibitor al eritropoezei*, Fiziol. norm. și patol., 1973, XIX, 4, 305—314.
- DUBERT, I. M., SLIZEWICZ, P., REBEYROTTE, P., MACHEBOEUF, M., *Nouvelle méthode de séparation des protéines sériques par le méthanol. Application aux sérums de lapin et de cheval*, Ann. Inst. Pasteur, 1953, 84, 370—375.
- DUKES, P. P., *Erythropoietin — stimulated incorporation of 1—¹⁴C glucosamine into glycolipids of bone marrow cells in culture*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, 31, 345.
- DUKES, P. P., *In vitro studies on DNA synthesis of bone marrow cells stimulated by erythropoietin*, Ann N. Y. Acad. Sci, 1968, 149, 437—444.
- DUKES, P. P., HAMMOND, D., SHORE, N. A., ORTEGA, J. A., *Erythropoietin. A complex with different in vivo and in vitro activities*, J. Lab. Clin. Med., 1970, 76, 3, 4, 39.
- ERSLEV, A. I., *Erythropoietic function in uremic rabbits*, Arch. Int. Med., 1958, C1, 407—417.
- ERSLEV, A. I., *Control of bred cell production*, Ann. Rev. Med., 1960, 2, 315.
- ESPADA, J., GUTNISKY, A., *Purificación de eritropoyetina urinaria humana*, Acta physiol. lat. amer., 1970, 20, 122.
- ESPADA, J., LANGON, A. A., DORADO, M., *Human erythropoietin studies on purity and partial characterization*, Biochim. Biophys. Acta, 1972, 285, 427—435.
- FAURA, J., RAMOS, J., REYNAFARJE, C., ENGLISH, E., FINNE, P., FINCH, C. A., *Effect of altitude on erythropoiesis*, Blood, 1969, 33, 668—676.
- FEENDERS, H., *Über die hämatopoetische Wirkung des Blutserums bei sekundärer Anämie*, Frankfurt Ztschr. Path, 1936, 49, 411—417.
- FELDMAN, S., RACHMILEWITZ, E. A., IZAK, G., *The effect of central nervous system stimulation on erythropoiesis in rats with chronically implanted electrodes*, The Journ. of Lab. a Clin. med., 1966, 67, 5, 713—725.
- FINNE, P. H., *Erythropoietin levels in the amniotic fluid, particularly in Rh-immunized pregnancies*, Acta Paediatr. Scand., 1964, 53, 269.
- FINK, G. D., FISHER, J. W., *Erythropoietin production after renal denervation or beta-adrenergic blockade*, Am. J. Physiol., 1976, 240, 2, 508.
- FINK, G. D., FISHER, J. W., *Role of the sympathetic nervous system in the control of erythropoietin production*, in *Kidney hormones* (J. W. Fisher ed), Academic Press, London, New-York, San Francisco, 1977, 387—413.
- ERSLEV, A. J., SOLIT, R. W., CAMISHION, R. C., AMSEL, S., ILDA, J., BALINGER, W. F., *Erythropoietin in vitro; III. Perfusion of a lung-kidney preparation*, Am. J. Physiol. 1965, 208, 1153—1157.
- FINK, G. D., PAULO, L. G., FISHER, J. W., *Effects of adrenergic blocking on erythropoietin production*, Feder. Proceed., 32 (3) Abs. 2696, 1973.
- FISHER, J. W., (edited by), *Kidney hormones, Erythropoietin*, vol. II, Academic Press London, New-York, San Francisco, 1977.



- FISHER, J. W., (Edited by), *Erythropoietin*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1968, 149.
- FISHER, J. W., ESPADA, J., TAYLOR, P., LERTORA, J. J. L., ROH, B. L., *A radioimmunoassay for human urinary erythropoietin*, in *Regulation of erythropoiesis* (A. S. Gordon, M. Condorelli and C. Peschle, eds), Publishing House Ponte, Milan, 1972, 122—131.
- FISHER, A. B., HYDE, R. W. and REIF, J. S., *Insensitivity of the alveolar septum to local hypoxia*, Amer. J. Physiol., 1972, 223/4, 770—776.
- FISHER, J. W., ROH, B. L., HALVORSEN, S., *Inhibition of erythropoietic effects of hormones by erythropoietin antisera in mildly plethoric mice*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1967, 126, 97.
- FISHER, J. W., ROH, B. L., MALGOR, L. A., SAMUELS, A. I., THOMPSON, J., NOVECK, R., ESPADA, J., in *Kidney hormones* (J. W. Fisher ed), Academic Press, London and New-York, 1971, 343—371.
- FISHER, J. W., SAMUELS, A. J., *Relationship between renal blood flow and erythropoietin production in dogs*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1967, 125, 2, 482—485.
- FISHER, J. W., SAMUELS, A. I., LANGSTON, J. W., *Effects of angiotensin and renal artery constriction on erythropoietin production*, J. Pharmacol. exp. Therap., 1967, 157, 618.
- FISHER, J. W., STUCKEY, W. J., LINDHOLM, D. D., GONZALEZ, F., LERTORA, J. J. L., MARIYAMA, J., BETTRAN, G., *The study of anemia in patients with renal disease*, Proc. 6th Ann. Contractor's Conf. Artif. Kidney Prog. NIAMDD. (K. K. Kruger ed), Bethesda. Md., 1973, 58—59.
- FISCHER, J. WOLF, R., LEON, A., *Technetium-99m as a label for erythrocytes*, Journal of Nuclear Medicine, 1967, 8, 229—232.
- FOA, C., *Hypertrophie des testicules et de la crête après l'extirpation de la glande pinéale chez le coq.*, Arch. ital. Biol., 1912, 57, 233.
- FOLKOW, B., RUBINSTEIN, E. H., *Effects of acute and chronic stimulations of the hypothalamic defence area in the rat*, Acta Physiol. Scand., 1966, 68, 48.
- FÖRSTER, J., *Luftverdünnung und Blutregeneration durch „Hämopoietine“*. Biochem Z., 1924, 145, 309—317.
- FRIED, W., De GOWIN, R., GURNEY, C. W., *Erythropoietic effect of testosterone in the polycythemic mouse*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 117, 839—842.
- FRIED, W., GURNEY, C. W., *The erythropoietic — stimulating effects of androgens*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968, 149, 356.
- FRIED, W., WEISMAN, M., MARTINSON, D., GURNEY, C. W., *The effect of hypoxia on colony-forming units in bone marrow*, J. Lab. & Clin. med., 1968, 71, 3, 422—428.
- FRIEDERICI, L., *Untersuchung zum Nachweis eines erythropoetischen Wirkstoffs (Erythropoetin) im Blut*, Folia haemat. (Frankfurt / M) N. F., 1963, 192—200.
- FRIEDERICI, L., FISCHER, J., *Die Erythropoese bei Nierenerkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der Erythropoetin- Aktivität des Blutes*, Folia Haematol. (Frankfurt), 1963, 8, 398.
- GARCIA, J. F., *Assays for erythropoietin*, in *Kidney hormones* (J. W. Fisher ed.), Academic Press, London New-York, San Francisco, 1977.
- GOLDWASSER, E., *The making of a red blood cell*, New Scientist, 1972, 558—561.
- GALLAGHER, N. L., Mc. CARTHY, J. M., LANGE, R. D., *Observations on erythropoietic stimulating factor (E. S. F.) in the plasma of uremic and non uremic anemic patients*, Am. int. Med., 1960, 52, 1201—1212.

- GALLAGHER, N. J., Mc. CARTHY, J. M., LANGE, R. D., *Erythropoietin production in uremic rabbits*, J. Lab. Clin. Med., 1961, 57, 2, 281—289.
- GALLAGHER, N. I., LANGE, R. D., *Anemia of uremia*, Proc. VII Congr. intern. Soc. Hemat., v. II, Ed. Il. pens. scient., Roma, 1960, 278—279.
- GALLIEN, ODETTE-LARTIGUE, GOLDWASSER, E., *On the mechanism of erythropoietin induced differentiation. I. The effects of specific inhibitors on hemoglobin synthesis*, Biochim. Biophys. Acta., 1963, 103, 319—324.
- GARCIA, J. F., SCHOOLEY, J. C., *Immunological neutralization of various erythropoietins*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1963, 112, 712—714.
- GOLDWASSER, E., *Erythropoietin and the differentiation of red blood cells*, Federation Proc., 1975, 34, 2285—2292.
- GOLDWASSER, E., *The purification and properties of erythropoietin: a critical review*, Proceed. of the Fourth International Conference on Erythropoiesis, University of Tokyo Press, 1975, 75—82.
- GOLDWASSER E., *Erythropoietin*, Blut, 1976, 33, 135—140.
- GOLDWASSER, E., KUNG, C. K.—H., *The molecular weight of sheep plasma erythropoietin*, Journ. Biol. Chem., 1972, 247, 5159—5160.
- GOLDWASSER, E., ELIASON, J. F., SILLEMA, D., *An assay for erythropoietin in vitro at the milliunit level*, Endocrinology, 1975, 97, 2, 315—323.
- GOLDWASSER, E., KUNG, C. K.—H., *Purification of erythropoietin*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1971, 68, 4, 697—698.
- GOLDWASSER, E., KUNG, C. K.—H., ELIASON, J. F., *On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation, XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action*, J. Biol. Chem., 1974, 249, 4202.
- GOLDWASSER, E., WHITE, W. F., TAYLOR, K. B., *Further purification of sheep plasma erythropoietin*, Biochim. biophys. Acta (Amst), 1962, 64, 487—496.
- GORDON, A. S., KAPLAN, S. M., *Erythrogenin* (REF), in *Kidney hormones* ed. J. W. Fisher), Ed. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977.
- GORDON, A. S., ZANJANI, E. D., *Mechanism of erythropoietin production*, Israel J. Med. Sci., 1971, 7, 963—971.
- GORDON, A. S., ZANJANI, E. D., WONG, K. K., COOPER, G. W., *Recent studies on the biogenesis of erythropoietin*. Atti del simposio internazionale sui fattori della eritropoiesi, Pavia, 1968, 19.
- GORIZONTOV, P. D., *Problema patogenezăa ostroi lucevoi bolezni v patofiziologhiceskom aspekte*, Mediținskaia radiologhiia, 1959, 1, 6.
- GOUDSMIT, R., KRUGES DAGNEAUX, P. V. L. C., KRIJNEN, H. W., *Oorspronkelijke stukken. Een immunochemische bepaling van erythropoietine*. Folia Med. Neerl, 1967, 10, 39—45.
- GRANT, W. C., LINKENHEIMER, W. H., PATTERSON, E. L., BERGER, H., *Partial purification of erythropoietin by alcoholic fraction*, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1961, 107, 221.
- GRANT, W. C., ROOT, W. S., *Fundamental stimulus for erythropoiesis*, Physiol. Rev., 1952, 32, 449—498.
- GROZA, P., *Mediul ambiant natural și reactivitatea organismului*. Ed. Acad. R. S. România, București, 1979.
- GUILLAIN, G., LEHELLE, P., GAREIN, R., *La polyglobulie de certains syndromes hypophysaires et hypophyso-tubériens*, Compt. Rend. Soc. Biol., 1931, 106, 7, 515—518.
- HALVORSEN, S., *Plasma erythropoietin levels following hypothalamic stimulation in the rabbit*, Scandianavian Journal of clinical Laboratory Investigation, 1961, 13, 4, 564—575.

- HALVORSEN, S., *Effects of ACTH on erythropoiesis in the rabbit*, Acta. physiol. scand., 1963, 58, 1, 30—39.
- HALVORSEN, S., FINNE, I., *Transfer of erythropoietin to amniotic fluid in Rh-immunized pregnant women*, Brit. Med. J., 1963, 5338, 1132—1134.
- HALVORSEN, S., *Plasma erythropoietin levels in cord blood and in blood during the first weeks of life*, Acta Paediatr., 1963, 52, 425.
- HALVORSEN, S., *Effects of hypothalamic lesions on the erythropoietic response to hypoxia in rabbits*, Acta physiol. scand., 1964, 61, 1—19.
- HALVORSEN, S., *The central nervous system in regulation of erythropoiesis*, Acta haemat., 1966, 35, 65—79.
- HALVORSEN, S., *Effects of hypothalamic stimulation on erythropoiesis and on the production of erythropoiesis-stimulating factors in intact and nephrectomized rabbits*, Ann. N. Y.—Acad. Sci., 1968, 149, 88.
- HALVORSEN, S., FINNE, P. H., *Erythropoietin production in the human fetus and newborn*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968, 149, 576.
- HAMMOND, D., SHERE, N., MOVASAGHI, N., *Production utilization and excretion of erythropoietin, I Chronic anemias II Aplastic crisis III Erythropoietic effects of normal plasma*, Ann of the N. Y. Acad. of Science, 1968, 149, 1, 516.
- HAMMOND, G. D., ISHIKAWA, G., KEIGHLEY, Y., *Relationship between erythropoietin and severity of anemia in hypoplastic and hemolytic states*, Erythropoiesis, Ed. L. O. Jacobson and Margot Doyle, Grune Stratton, N. Y. London, 1962, 351.
- HEYLMAYER, L., *Zur Physiologie und Pathologie der Erythrocytenregulation* Verhandl deutsch. Gesellsch. Inn. Med., 1933, 45, 113—118.
- HEYMANS, C., BOUCKAERT, J. J., *Les chémorécepteurs du sinus carotidien*, Ergebnisse Physiol., 1939, 41, 28—55.
- HEYMANS, C., BOUCKAERT, J. J., REGNIERS, P., *Le sinus carotidien*, Doin et Cie, Paris, 1933.
- HENSEL, H., HILDEBRANDT, G., *Organ systems in adaptation: the nervous system*, in *Handbook of Physiology*, section 4, American Physiological Society, Washington, D. C., 1964, 55.
- HESS, W. R., *Die funktionelle Organisation des vegetativen Nervensystems*, B. Schwabe and Co Verlag, Basel, 1948.
- HIRASHIMA, K., TAKAKU, F., *Experimental studies on erythropoietin II. The relationship between juxtaglomerular cells and erythropoietin*, Blood, 1962, 20, 1.
- HIRSJÄRVI, E., *Erythrocytosis-promoting activity in stagnant blood and in blood subjected to low atmospheric pressure in vitro*, Ann. med. exp. a. biol. Fenniae, 1953, 31, 7—77.
- HODGSON, G., *Radiosensitivity of marrow cells responsible for reestablishing erythropoiesis in lethally irradiated mice*, Acta Physiol. Latinoam. 1962, 12, 365—369.
- HODGSON, G., ESKUCHE, I., YUDILEVICH, D., HERNANDEZ, P., TOHÁ, J., *Effect of plasma from bled and phenylhydrazine treated animals on plasma iron turnover. A test for „hemopoietine“*, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1957, 96, 826—829.
- HODGSON, G., PERRETA, M., YUDILEVICH, D., ESKUCHE, I., *Assay of „Hemopoietine“ in starved animals; properties of urinary hemopoietine*, Proc. Soc. exper. biol. med., 1958, 99, 137—142.
- HODGSON, G., TOHÁ, J., *The erythropoietic effect of urine and plasma of repeatedly bled rabbits*, Blood, 1954, 9, 299—309.



- HOFF, F., *Blut und vegetative Regulation*, Erg. inn. Medizin. u. Kinderh., 1928, 33, 195—265.
- HOFF, F., *Beiträge zur Frage der Blutregulation*, Verhandl. deutsch. Gesellsch. inn. Med., 1933, 45, 124—133.
- HRINDA, M. E., GOLDWASSER, E., *On the mechanism of erythropoietin induced differentiation*, Biochim. biophys. acta, 1969, 195, 165—175.
- JACOBSON, L. O., DOYLE, MARGOT, *Erythropoiesis*, (Ed. by.) Grune Stratton New York and London, 1962.
- JACOBSON, L. O., GOLDWASSER, E., FRIED, W., PLZAK, L., *Role of the kidney in erythropoiesis*, Nature, London, 1957, 179, 633—634.
- JACOBSON, L. O., MARKS, E. K., GASTON, E. O., GOLDWASSER, E., *Studies on erythropoiesis XI. Reticulocyte response of transfusion-induced polycythemic mice to anemic plasma from nephrectomized mice and to plasma from nephrectomized rats exposed to low oxygen*, Blood, 1959, 14, 635—645.
- JAROSEVSKI, A. I., SEHTER, S. I., *O bliianii sivorotok bolinîh anemiiami na eritropoez*, Probl. ghematol. i peril. krovi., 1959, 4, 17—24.
- KAISER, S. M., CUMMINGS, J. N., REYNOLDS, S. R. M., MARBARGER, J. P., *Acclimatization response of the pregnant ewe and fetal lamb to diminished ambient pressure*, J. appl. physiol., 1958, 13, 1971.
- KEIGHLEY, G., HAMMOND, D., LOWY, P. H., *The sustained action of erythropoietin injected repeatedly into rats and mice*, Blood, 1964, 23/1, 99—1071.
- KILBRIDGE, T., FRIED, W., *Response of mice with a decreased number of hematopoietic stem cells to doses of erythropoietin*, J. Lab. Clin. Med., 1968, 72, 85—92.
- KOMIYA, E., *Die zentralnervöse Regulation des Blutbildes*, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1956.
- KOVÁCH, A. G. B., *Hemodynamic alterations and regional blood flow in hemorrhagic shock. Regulation of capacitance vessels*. Akadémiai kiadó, Budapest, 1978.
- KRANTZ S. B., JACOBSON L. O., (Edited by.) *Erythropoietin and the Regulation of Erythropoiesis*, The University of Chicago Press, Chicago and London, 1970.
- KRANTZ, S. B., GOLDWASSER, E., *On the mechanism of erythropoietin induced differentiation. II. The effect on RNA synthesis*, Bioch. Biophys. Acta, 1965, 103, 325—332.
- KRANTZ, S. B., GOLDWASSER, E., *On the mechanism of erythropoietin induced differentiation. IV. Some characteristics of erythropoietin action on hemoglobin synthesis in marrow cell culture*, Biochim. Biophys Acta, 1965, 108, 455—462.
- KRUGERS DAGNEAUX, P. G., GOUDSMIT, L. C. R., KRIJNEN, H. W., *Investigation on an immunoassay of erythropoietin*, Ann, N. Y. Acad. Soci., 1968, 149, 294—297.
- KRZYMOWSKI, TADEUSZ, CZARNYSZEWICZ, JERZY, *Erythropoetyna w osoczu w warunkach fizjologicznych*, Acta Physiol. Polonica, 1964, XV, 2, 165—171.
- KRZYMOWSKI, T., KRZYMOWSKA, H. K., *Studies on the erythropoiesis inhibiting factor in the plasma of animals with transfusion polycythemia*, Blood, 1962, 19, 1, 38—41.
- KURATOWSKA, Z., *The mechanism of the production and action of renal erythropoietin*, Simposio intern. sui fattori della eritropoesi, Pavia, 1968. Ed. Italseber, Milan 1968.

- KURATOWSKA, Z., LEWARTOWSKI, B., LIPINSKI, B., *Chemical and biologic properties of an erythropoietin-generating substance obtained from perfusates of isolated anoxic kidneys*, J. Lab. Clin. Med., 1964, 64, 2, 226—237.
- KURATOWSKA, Z., LEWARTOWSKI, B., MICHALAK, E., *Studies on the production of erythropoietin by the isolated hypoxic kidney*, Bull. Acad. Pol. Sci., 1960, 8, 77—80.
- KURATOWSKA, Z., LEWARTOWSKI, B., MICHALAK, E., *Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs*, Blood, 1961, 18, 5, 527—534.
- LABORIT, H., *Les régulations métaboliques*, Ed. Masson et Cie, Paris, 1965.
- LAJTHA, L. G., *Stem cell kinetics and erythropoietin*. *Erythropoiesis*, L—O. Jacobson Ed. New-York—London, Grune Stratton, 1962, 140.
- LAJTHA, L. G., *Cytokinetics and regulation of progenitor cells*, J. Cell. Physiol. Suppl., 1966, 1, 67 : 133.
- LANGE, R. D., ICHIKI, A. T. in *Kidney hormones* (J. W. Fisher ed.), Academic Press. London and New-York, 1977, 111—145.
- LANGE, R. D. in *Peptide hormones* (S. A. Berson and R. S. Yalow, eds), North Holland, Amsterdam, 1973, 1124—1130.
- LANGE, D. R., Mc DONALD, L. F., JORDAN, T., *Antisera to erythropoietin partial characterization of two different antibodies*, J. Lab. Clin. Med., 1969, 73, 1, 78—90.
- LANGE, R. D., GARDNER, E., WEIGHT, C. S., GALLAGHER, N. I., *Neutralization of the biologic activity of erythropoietin by immune sera*, Proc. IX, Cong. Intern. Soc. Hemat., 1962, 3, 135—141.
- LANGE, R. D., JORDAN, T. A., ICHIKI, A. T., CHERNOFF, A. I., in *Regulation of erythropoiesis* (A. S. Gordon, M. Condorelli and C. Peschle, eds), Publishing House Ponte, Milan, 1972, 107—118.
- LANGE, D. R., O'GRADY, L. F., LEWIS, J. P., TROBAUGH, J. E. Jr., *Application of erythropoietin antisera to studies of erythropoiesis*, Ann N. Y. Acad. Sci., 1968, 149, 281—291.
- LATNER, A. L., *The carotid sinus and blood regeneration*, Journal of Physiology, 1938, 93, 75—80.
- LERTORA, J. J. L., DARGON, P. A., FISHER, J. W., *Radioimmunoassay of erythropoietin in serum from normal and anemic human subjects*. Fed. Proceed., 1973, 32, 3, 872.
- LERTORA, J. J., DARGON, P. A., REGE, A. B., FISHER, J. W., J. Lab. Clin. Med., 1975, 86, 140—151.
- LIERE, van E. I., *Anoxia, its effect on the body*, Chicago. Univ. of Chicago Press, 1942.
- LIBBIN, R. M., and GORDON, A. S., *Participation of renal lysosomes in the biogenesis of erythropoietin*, Fed. Proc., 1974, 33, 3, Abstr., 846, 355.
- LINDEMANN, R., *Erythropoiesis-inhibiting factor (s): methodologic studies*, Blood, 1976, 47, 155—163.
- LINKE, V. G., *Beeinflussung der Reticulozitenzahl durch Reizung vegetativer Nervenstämmе in der Bauchhöhle des Kaninchens*, Z. Biol., 1955, 167, 429—459.
- LINKE, P. G., *Über den Einfluss elektrischer Hypothalamusreizungen auf den Retikulozytenwert des Kaninchens*, Zeitschrift für Biologie, 1958, 110, 2, 111—131.
- LINMAN, J. W., BETHELL, F. H., *The plasma erythropoietic stimulating factor. (Observations on circulating erythrocytes and marrow of rats receiving protein-free extracts of rabbit plasma)*, Blood, 1956, 11, 310—323.

- LOO JEN HONG, LEE CHENG-CHUN, FLEMING, M., *Erythropoietic activity of proteolytic enzymes*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 104, 39—40.
- LOWY, P. H., KEIGHLEY, G., BORSOOK, H., *Inactivation of erythropoietin by neuraminidase and by mild substitution reactions*, Nature, 1960, 185, 102—103.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. I., RANDALL, R. I., *Protein, measurement with the Folin phenol reagent*, J. Biol. Chem., 1951, 193, 265—275.
- LÜBBERS, D. W., *Physiologie der Gehirndurchblutung in Der Hirnkreislauf* (sub. red. H. Gänshirt), Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1972.
- LÜBBERS, D. W., BAUMGÄRTL, M., *Herstellungstechnik von palladinierten Pt-Stich-elektroden (1—5 Aussendurchmesser) zur polarographischen Messung des Wasserstoffdruckes für die Bestimmung der Mikrozirkulation: Pflüger's Arch. ges. Physiol.*, 1967, 194, 39.
- LUCARELLI, G., PORCELLINI, A., CARNEVALI, C., CARMENA, A., STHOLMAN, F. R. jr., *Fetal and neonatal erythropoiesis*, Ann N. Y. Acad. Sci., 1968, 149, 544.
- LUKOWSKY, W. A., PAINTER, R. H., *Molecular weight of erythropoietin determined by gel filtration*, Canad. J. Biochem., 1968, 46, 731—734.
- MAGNUSSEN, J. D., *The influence of oxygen tension on the production of erythrocytes in vitro*, Acta pharmacol. toxicol., 1949, 5, 153—163.
- MAHADEVAN, S., TAPPEL, A. L., *β -aspartil-glucozamine amido hydrolase of rat liver and kidney*, J. Biol. Chem., 1967, 242, 20, 4568.
- MAKAROV, V. P., *Rolul eritropoetinei extrarenale in reglarea eritropoezei in Analiza reglării sistemului sanguin a seriei roșii*, Krasnoiarso, 1975, 132—134.
- MALPOIX, P., *Effects of erythropoietin in chick embryos*, Bioch. Bioph. Acta, 1967, 145, 181.
- MAUSS, H., KÜNKEL, H. A., MAYER, H. S., *Weitere Untersuchungen über die Strahlenschutzwirkung des Erythropoietins*, Strahlentherapie, 1969, 64, 155.
- MATOTH, J., ZAIZOV, R., *Regulation of erythropoiesis in the fetal rat*, Isr. J. Med. Sci., 1971, 7, 839.
- MELLANDER, S., JOHANSSON, B., *Control of resistance, exchange and capacitance functions in the peripheral circulation*, Pharmacol. Rev., 1968, 20, 117.
- MIESCHER, F., *Über die Beziehungen zwischen Meershöhe und Beschaffenheit des Blutes*, Cor. Bl. Schweiz. Aerztebl., 1893, 23, 809.
- MIESCHER, Fr., *Die histochemische und physiologische Arbeiten von Fr. Miescher*, Leipzig, 1897.
- MILCU, Șt. M., *Cybernetic patterns in endocrinology in Biokybernetik*, I, Karl. Marx Universität, Leipzig, 1968, 133—140.
- MIRAND, E. A., GRACE, J. T., JOHNSTON, G. S., MURPHY, G. F., *Effects of hypothalamic stimulation on the erythropoietic response in the rhesus monkey*, Nature, 1964, 204, 1163—1165.
- MIRAND, E. A., MURPHY, G. P., STEEVES, R. A., GROENEWALD, J. M., DEKLERK, J. N., *Erythropoietin activity in anephric, allotransplanted, unilaterally nephrectomized, and intact man*, J. Lab. a Clin. Med., 1969, 73, 1, 121—128.
- MIRAND, E. A., PRENTICE, T. C., *Presence of plasma erythropoietin in hypoxic rats with or without kidney and or spleen*, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1957, 96, 1, 49—51.

- MIRAND, E. A., PRENTICE, T. C., *Fe⁵⁹ assessment of erythropoiesis in mice following injections of anemic rabbit plasma extracts*, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1957, 95, 164—167.
- MIRAND, E. A., STEEVES, R. A., GROENEWALD, J. H., VAN ZYL, J. J. W., MURPHY, G. P., *Extra-renal erythropoietin production in the baboon*, Proceedings of the Society for Exp. Biol. a. Med., 1969, 130, 3, 685—688.
- MIRAND, E. A., MURPHY, G. P., *Erythropoietin alterations in human liver disease*, N. Y. State J. Med., 1971, 71, 860.
- MIRAND, E. A., ZUCALI, J. R., MURPHY, G. P., *Role of liver in erythropoietin production*, N. Y. State J. Med., 1976, 76, 1100.
- MIYAKE, T., CHARLES, K.—KUNG, H., GOLDWASSER, E., *Purification of human erythropoietin*, Journ. biol. chem., 1977, 252, 15, 5558—5564.
- MUNTZ, A., *De l'enrichissement du sang en hémoglobine, suivant les conditions d'existence*, Compt. rend. Acad. sc., 1891, 112, 298—301.
- MURPHY, G. P., MIRAND, E. A., KENNY, G. M., *Renal and extra-renal erythropoietin in man*, N. Y. Stat. J. Med., 1969, 69, 2007.
- NAETS, J. P., *The kidney and erythropoiesis*, Nature, 1958 a, 182, 1516—1517.
- NAETS, J. P., WITTEK, M., *Mechanism of action of androgens in erythropoiesis*, J. amer. physiol., 1966, 210, 2, 315.
- NAKAO, K., KIMURA, K., MIURA, Y., TAKAKU, F., *Erythropoietin associated with carcinoma of the liver (with erythropoietin assay of tumor extract)*, Am. J. Med. Sci., 1966, 251, 161.
- NATSCHIEFF, N., *Veränderungen in der Hämapoese bei Hunden nach Reizung im Bereich des Hypothalamus*, Dokl. Bolg. Acad. Nauk., 1961, 14, 321—324.
- NEČAS, E., THORLING, E. B., *Unresponsiveness of erythropoietin producing cells to cyanide*, Am. J. physiol., 1972, 222, 1187—1190.
- NICOLAU, EDM., BĂLĂCEANU, C., *Cibernetica*, Ed. științifică, București, 1961.
- NÖLLER, H. G., *Eine einfache Methode der intravitalen Knochenmarkpunktion bei der Ratte*, Pfl. Arch. f. die ges. Physiol., 1957, v. CCLXIV, 651—653.
- OLINIC, N., OLTEANU, A., BANEAN, M., PRODAN, T., DOROFTEIU, M., *Comportarea factorilor umorali de reglare a eritropoezei în evoluția cordului pulmonar cronic*, Doc. haemat., 1972, 1, 49—58.
- OLTEANU, A., *Reglarea eritropoezei în perioada fetală și neonatală*, Teză de doctorat, IMF Cluj-Napoca, 1980.
- OPITZ, E., *Über akute Hypoxie*, Ergebnisse der Physiologie, biologische Chemie und experimentellen Pharmakologie, 1941, 44, 315.
- PAPILIAN, V., JIANU, S. J., *Der Einfluss des vegetativen Systems auf das Knochenmark*, Virch. Arch. path. Anat., 1927, 264, 361.
- PAULO, L. G., ROH, B. L., FISHER, J. W., *Inhibition effects of atropine on the erythropoietic effects of hypothalamic stimulation and hypoxia*, Fed. proceed., 1972, 31, (2), 510 abstr, 1674.
- PAVLOV, A. D., *Molecular aspects of action of endogenous erythropoietin. The effects of erythropoietic stimulation on synthesis of ribonucleic acids in rabbits bone marrow*, Biochim. biophys Acta, 1969, 156, 195.
- PAVLOVIC—KENTERA, V., LANGE, R. D., LEWIS, J. P., GARDNER, E. Jr., *Effect of erythropoietin and antisera to erythropoietin on the in vitro Fe⁵⁹ incorporation by rabbit bone marrow cells*, Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta., 1965, 1, 15.
- PAVLOVIC—KENTERA, ICHIKI, H. T., LANGE, R. D., *Exp. Hematol.*, 1973, 1, 222—230.
- PERRETTA, M., *Different (¹⁴C) formate and (6—¹⁴C) orotic acid incorporation patterns in the nucleic acids of spleen from normal and polycythemic*

- mice treated with erythropoietin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 142, 548.
- PERRETTA, M., BOSCO, C., *Effect of erythropoietin on the activity of RNA polymerase*, *Experientia*, 1970, 26, 6, 594.
- PERRETTA, M., TIRAPEUGI, C., *Effect of erythropoietin on nucleic acid metabolism from polycythemic rat bone marrow*, *Experientia*, 1968, 2417, 680—681.
- PERRETTA, M. P., RUDOLPH, W., PERRETTA, M., HODGSON, G. *Effect of erythropoietin on ^{14}C formate incorporation into rat bone marrow RNA*, *B.B.A.*, 1965, 95, 360, 26.
- PILIERO, S. J., MEDICI, P. T., ORR, A., *Influence of hypoxic stimuli upon erythropoiesis in hypothalamic-lesioned animals*, *Erythropoiesis*, Edited by L. O. Jacobson Grune and Stratton, New-York London, 1962.
- PLZAK, L. T., FRIED, W., JAKOBSON, L. O., BETHARD, W., *Determination of stimulation of erythropoiesis by plasma from anaemic rats using ^{59}Fe* , *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, 46, 671—678.
- PORTER, Ch. B., SMALL, J. T., *Proc. of the Soc. of exp. Biol. a Med.*, 1947, 54, 239.
- PROSSER, L. C., *Perspectives of adaptation: theoretical aspects*, *Handbook of Physiology*, Sect. IV. Ed. D. B. Diell, Washington, 1964, 11.
- PUSCHMANN, M., THORN, W., YEN, Y., *Partial purification procedure for human urinary erythropoietin by preparative isotachophoresis*, *Res. Exp. Med. (Berl.)* 1978, 173, 293—296.
- RANSON, S. W., MAGOUN, H. W., *The hypothalamus*, *Ergebn. Physiol*, 1939, 41. 56.
- REISSMANN, K. R., *Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia*, *Blood*, 1950, 5, 372—380.
- REYNAFARJE C., RAMOS, J., FAURA, J., VILLAVICENCIO, D., *Humoral control of erythropoietic activity in man during and after altitude exposure*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1964, 116, 649.
- RODGERS, G. M., *Lactate stimulation of renal cortical adenylate cyclase a mechanism for erythropoietin production following cobalt treatment or hypoxia*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1974, 190, (3) 542—50.
- ROSENFELD, EVA, *Despre reglarea neuro-umorală a eritropoezei*, Teză de doctorat IMF Cluj, 1967.
- ROSENFELD, EVA, DANIELLO, RODICA, RUSU, M., CRÎSNIC, G., *Actiunea unor proteaze asupra proprietăților biologice ale eritropoietinei*, *Fiziol. norm. patol.*, 1965, XI, 6, 555—561.
- ROSSE, W. J., BERRY, R. J., WALDMAN, T. A., *Some molecular characteristics of erythropoietin from different sources determined by inactivation by ionizing radiation*, *J. Clin. Invest.*, 1963, 42, 124.
- RÖSSNER, W., ZIPF, K., *Einfache Technik zur Herstellung von Hirn-Schnittserien für stereotaktische Untersuchungen*, *Pfl. Archiv*, 1961, 273, 400—406.
- RUCH, T. G., PATTON, H. D., *Physiology and biophysics*, W. B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1965.
- RUDOLPH, W., PERETTA, M., *Effects of erythropoietin on ^{14}C formate uptake by spleen and bone marrow nucleic acid of erythrocytetransfused mice*, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1967, 124, 1041.
- RUHENSTROTH—BAUER, G., *Versuche zum Nachweis einer spezifischen erythropoietischen Hormons*, *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1950, 211, 32—56.
- SAMUELS, A., MOLLER, L., FISHER, J., *Effects of acetylcholinesterase on erythropoiesis in polycythemic and mildly plethoric mice*, *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 1968, 149, 406—409.

- SAPIRSTEIN, L. A., *Am. J. Physiol.*, 1958, 193, 161.
- SÄHLEANU, V., *Homeostazia*, in *Muncitorul sanitar*, 1967, 19, 42, (906), 1—2.
- SÄHLEANU, V., *Eseu de biologie informațională*, Ed. științifică, București, 1973.
- SCARPELLI, E. M., *The surfactant system of the lung*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1968.
- SCHAUMAN, ROSENQVIST, *Über die Natur der Blutveränderungen im Höhenklima*, *Zeitschr. f. klin. Med.*, 1898, 35.
- SCHNEIDER, D. O., WHITMORE, G. F., *Comparative effects on neutrons and X-ray on mamalian cells*, *Rad. Res.*, 1963, 18, 286.
- SCHOOLEY, J. C., *Immunological studies of erythropoietin in vivo using anti-erythropoietin immune serum*, in *Kidney hormones* (ed. by J. W. Fisher), Academic Press, London New-York, San Francisco, 1977.
- SCHOOLEY, J. C., GARCIA, J. J., *Immunochemical studies of human urinary erythropoietin*, *Proc. Soc. exper. biol. med.*, 1962, 109, 325.
- SCHOOLEY, J. C., GARCIA, J. F., *Immunologic studies on the mechanism of action of erythropoietin*, *Proc. soc. exp. biol. (N. Y.)*, 1962, 110, 636—641.
- SCHOOLEY, J. C., GARCIA, J. F., *Some properties of serum obtained from rabbits immunized with human urinary erythropoietin*, *Blood*, 1965, 25, 204—217.
- SCHOOLEY, J. C., GARCIA, J. F., CANTOR, J. N., HAVENS, V. W., *A summary of some studies on erythropoiesis using antierythropoietin immune serum*, *N. Y. Ann. Acad. Sci.*, 1968, 149, 266.
- SCHOOLEY, J. C., ZANJANI, E. D., GORDON, S. G., *Immunologic aspects of the biogenesis of erythropoietin*, *Blood (Londra)*, 1970, 35, 3, 276—281.
- SCHULHOF, K., MATHIES, M. M., *Polyglobulia induced by cerebral lesions*, *J.A.M.A.*, 1927, 89, 2093—2094.
- SELYE, H., *The stress of life*, Ed. McGraw Hill, New York, 1956.
- SEIP, M., *Reticulocyte studies*, *Acta. med. scand. suppl.*, 1953, 282.
- SEIP, M., *The reticulocyte level and the erythrocyte production judged from reticulocyte studies, in newborn infants during the first week of life*, *Acta paed. (Stockh.)*, 1955, 44, 355.
- SEIP, M., HALVORSEN, S., ANDERSEN, P., KAADA, B. R., *The effect of hypothalamic stimulation on the erythropoiesis in rabbits*, *Acta physiol. scand.*, 1960, 50, suppl. 175, 141—142.
- SEIP, M., HALVORSEN, S., ANDERSEN, P., KAADA, B. R., *Effects of hypothalamic stimulation on erythropoiesis in rabbits*, *Scand. journ. clin. lab. invest.*, 1961, 13, 4.
- SELIGMAN, A. M., NACHLAS, M. M., *Methods of enzymatic analysis*, Ed. Bergmeyer H. U. Chem. Acad. Press., 1963, 776.
- SELKURT, E. E., *Status of investigative aspects of hemorrhagic shock*, *Federation Proceedings*, 1970, 29, 6.
- SEPSELEVICI, L. L., *Izucenie obmena jaleza u obluciennih sobak v povisennoi funkcii eritropoeza*, *Probl. ghematol. i pereliv. krovi*, 1959, 4, 10, 9—14.
- SHIBKO, S., TAPPEL, A. L., *Rat kidney lysosomes isolation and properties*, *Biochem. J.*, 1965, 95, 731.
- SILVER, I. A., *Some observation on the cerebral cortex with an ultramicro-membrane covered oxygen electrode*, *Med. electron. biol. enging.*, 1965, 3, 377.
- SLAUNWHITE, W. R., MIRAND, E. A. Jr., PRENTICE, T. C., *Probable polypeptide nature of erythropoietin*, *Proc. soc. exper. biol. med.*, 1957, 96, 616—619.

- SMITH, L. H., *Hemopoietic stem-cell number and radiosensitivity: radioprotection with phenylhydrazine*, Trans. N. Y. Acad. Sci., 1970, 32, 448—452.
- SMITH, L. H., Mc KINLEY, T. W., *Protection of mice against radiation injury by phenylhydrazine*, Proc. soc. exp. biol. med., 1968, 129, 3.
- SOULARIAC, A., SOULARIAC, M. L., *Rhinencéphale et structure épithalamo-épiphysaires*, Ann. Endocr. (Paris), 1963, 24, 271.
- STOHLMAN, F. S. Jr., *Humoral regulation of erythropoiesis. VII. Shortened survival of erythrocytes produced by erythropoietin or severe anemia*, Proc. soc. exp. biol. med., 1961, 107, 884.
- STOHLMAN, J. F., BRECHER, G., *Stimulation of erythropoiesis in sublethally irradiated rats by a plasma factor*, Proc. soc. exp. biol. N. Y., 1956, 91, 1, 1—4.
- STOHLMAN, F. Jr., BRECHER, G., *Humoral regulation of erythropoiesis. III. Effect of exposure to simulated altitude*, J. lab. clin. med., 1957, 49, 890—895.
- STOHLMAN, F. Jr., EBBE, S., MORSE, B., HOWARD, D., DONOVAN, J., *Regulation of erythropoiesis XX Kinetics of red cell production*, N. Y. Ann. Acad. Sci., 1968, 149, 156—172.
- STOHLMAN, J. F., RATH, C. E., ROSE, J. C., *Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis; studies on a patient with polycythemia secondary to regional hypoxia*, Blood, 1954, 9, 721—733.
- TAKAJI, MIYAKE, KUNG, C. K. H., GOLDWASSER, E., *Purification of human erythropoietin*, Journ. biol. chem., 1977, 252, 15, 5558—5564.
- TAKAKU, F., HIRASHIMA, K., NAKAO, K., *Studies on the mechanism of erythropoietin production. I. Effect of unilateral constriction of the renal artery*, J. lab. clin. med., 1962, 59, 5, 815—820.
- TAKAKU, F., HIRASHIMA, K., OKINAKA, S., *Studies on the mechanism of erythropoietin production II. Effect of bilateral section of the splanchnic nerves*, J. lab. clin. med., 1962, 59, 5, 821—825.
- TAKAKU, J., NAKAO, K., TONO, TERAYAMA, H., *Changes in histone acetylation and RNA synthesis in the spleen of polycythemic mouse after erythropoietin injection*, B.B.A., 1969, 195, 396—400.
- TEI Y U-TIN, *Studies on the hemopoietic substance in blood under various conditions III. Production of hemopoietic substance in the serum of venesected anemic rabbit*, J. Chosen M. A., 1938, 28, 129.
- TERZIOGLU, M., *The possible mechanisms of the stimulation of hemopoiesis under reduced barometric pressure*, Israel Journal of Medical Sciences, 1965, 1, 6, 1295—1303.
- TERZIOGLU, M., GÖRAL, B., BARDAVIT, I., *Influence of chemoreceptor denervation and subsequent discontinuous anoxia on erythropoiesis and acid-base equilibrium in the rabbit*, Amer. J. Physiol., 1955, 182, 100—104.
- TRIBUKAIT, B., *Über die Änderungen der natürlichen Strahlenresistenz der Maus nach mehrtägigen Aufenthalt in Hypoxie. Überleben und Körpergewicht*, Strahlentherapie, 1966, 131, 371.
- UJANSKI, I. G., *K probleme autoregulatii eritropoeza*, Arhiv. Patol., 1959, 21, 6, 3—17.
- UNGAR, G., *Excitation*, Ed. C. Thomas, Springfield, Illinois U.S.—A., 1963.
- URSO, P., CONGDON, C. C., *The effect of the amount of isologous bone marrow injected on the recovery of hematopoietic organs, survival and body weight after lethal irradiation injury in mice*, Blood, 1957, XII, 3, 251—260.

- VAN DYKE, D. C., CONTOPOULOS, A. N., WILLIAMS, B. S., SIMPSON, M. E., LAWRENCE, J. H., EVANS, H. M., *Hormonal factors influencing erythropoiesis*, Acta haemat., 1954, 11, 203—222.
- VASILE AL. VASILE, *Purificarea cromatografică a eritropoietinei și studiul proprietăților ei biologice* Teză de doctorat, 1971.
- VÂLCU, Eritrocitul., Ed. medicală, București, 1977.
- VIAULT, F., *Sur l'augmentation considérable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des hauts plateaux de l'Amérique du Sud*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 1890, 111, 917.
- WADE, O. L., BISHOFF, J. P., *Cardiac output and regional blood flow*, Clackwel Scient. Publications, Oxford 1962.
- WANG, S. I., VERZAR, F., *Erythropoiesis in der Höhe von 1880 m bei normalen und thyroidektomierten Kaninchen*, Schweiz. med. Wschr., 1949, 79, 713—715.
- WARREN, C., Am. J. Physiol., 1941, 133, 482.
- WEBER, K., OSBORN, M., *The reliability of molecular weight determination by dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, J. Biol. Chem., 1969, 244, 4406.
- WESPI, H., *Der Einfluss subkortikaler Hirnreizung auf das Blutbild*, Folia Haemat., 1944, 68, 176.
- WIENER, N., *Cibernetica*, Ed. științifică, București, 1966.
- WIGGERS, H. C., INGRAHAM, R. C., *Hemorrhagic shock. Definition and criteria for its diagnosis.*, J. clin. invest., 1946, 25, 30—36.
- WHITE, W. F., GURNEY, C. W., GOLDWASSER, E., JACOBSON, L. O., *Studies on erythropoietin*, Recent Progr. Hormone Res., 1960, 16, 219—262.
- ZANJANI, E. D., *Evidence for a physiologic role of erythropoietin in fetal erythropoiesis*, Blood, 1974, 44, 285—90.
- ZANJANI, C. D., COOPER, G. W., GORDON, A. S., WONG, K. K., SERIBNER, V. A., *The renal erythropoietic factor (REF) IV. Distribution in mammalian kidneys*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 126, 2, 540—542.
- ZANJANI, S. D., HORGER, E. O., GORDON, A. S., CANTOR, L. N., HUTCHINSON, D. L., *Erythropoietin production in the fetal lamb*, J. Lab. Clin. Med., 1968, 74, 782.
- ZANJANI, E. D., GORDON, A. S., *Erythropoietin production and utilization in fetal goats and sheep*, Isr. J. Med. Sci., 1971, 7, 850.
- ZANJANI, E. D., MANN, L. I., BURLINGTON, H., GORDON, A. S., WASSERMAN, L. R., *Evidence for a physiologic role of erythropoietin in fetal erythropoiesis*, Blood, 1974, 44, 285.
- ZANJANI, E. D., PETERSON, E. D., GORDON, A. S., WASSERMAN, L. R., *Erythropoietin production in the fetus: role of the kidney and maternal anemia*, J. Lab. Clin. Med., 1974, 83, 281.
- ZANJANI, E. D., POSTER, J., MANN, L. J., WASSERMAN, L. R., *Regulation of erythropoiesis in the fetus in Kidney hormones*, Ed. J. W. Fisher, Acad. Press., 1977, 463.
- ZIH, A., *Untersuchungen über den auf die Blutbildung wirksamen Stoff des anämischen Serums*, Pflüger's Archiv. f. d. ges. Physiol., 1930, 225, 613—620.
- WEINTRAUB, A. H., GORDON, A. S., COMISCOLI, J. F., *Use of the hypoxia-induced polycythemic mouse in the assay standardization of erythropoietin*, J. Lab. Clin. Med. 1963, 62, 5, 743—752.

SUMMARY

OXYGEN HOMEOSTASIS

The maintenance of a constant oxygen concentration in the interstitial fluid of higher organisms is achieved by the integration of a complex of functional systems, under nervous, endocrine and humoral control, the main roles being played by respiration, circulation and blood.

Pulmonary ventilation ensures a continuous oxygen supply from the inspired atmospheric air, where its partial pressure is 150 mm Hg, towards the pulmonary alveoli. The equilibrium between the respiratory supply of oxygen and the varying quantity fixed on the blood, provides through the nervous regulation of respiration, the maintenance of a homeostatic level of the alveolar pressure of this gas.

In the text of the monograph the ventilatory functions and the structural and functional factors contributing to the maintenance of alveolar oxygen supply, their fixation on the blood and its circulatory transport are analyzed. The role of the blood flow in oxygen homeostasis, particularly the maintenance of its constant tissue pressure are presented.

Less known from the functional point of view, but of great importance for oxygen homeostasis, is the physiology of erythron as a morphofunctional system, composed of the erythropoietic bone marrow and the circulating erythrocytes, regulated by erythropoietin.

Data concerning the role and mechanisms of humoral and nervous regulation of the erythron are analyzed, in connection with the variations of the oxygen pressure, in the context of recent investigations and personal contributions.

ERYTHROPOIETIN ASSAY

As compared with the method described by Borsook and al. (1954) for the obtention of erythropoietin by boiling anemic serum in supernatant in view of its biological assay, Baciú, Rosenfeld, Dorofteiu, Rusu (1959) suggested its isolation by precipitation with acetate-acetic acid in methanol (Dubert et al. 1953). Erythropoietin appears in fraction II, containing alpha, beta₁ and beta₂ globulins. Recovery of the erythropoietic activity in this fractions is 100%, as against the whole serum and the extract can be used for testing.

A technique for the assay of erythropoietin on extracts of rat femoral bone marrow maintained *in vitro* in a culture medium for 15 hours is described (Borbély 1964). Appreciation was made by the proliferation of the medullary red blood cells from the marrow fragment and the

proportion of the increase of nucleated cells in the culture medium (fig. 17). The technique is rapid, but offers only orientative values.

The antigenic capacity (formation of skin sensitizing antibodies) has also been used for assay (Baciu, Dorofteiu, Olteanu, Vasile, 1968, 1971). An erythropoietin antiserum was prepared by administering into guinea pigs, 8000 times purified erythropoietin, obtained from rabbit or sheep serum.

By intradermic reactions „in vivo“, the skin-sensitizing antibodies (reagins) were enhanced in the antierythropoietin serum. This was injected intradermally in the abdominal region of white rabbits, in various dilutions and endogenous erythropoietin production was stimulated by hypobaric hypoxia (5500 m) of varying duration, or by phenylhydrazine anemia. The results were evaluated 45 minutes after i.v. injection of 1,25 ml per kg body weight of 2% Evans blue (fig. 22). The cutaneous sensitizing antibodies were attached to the second fraction (Dubert and al. 1953) of the immune serum containing the alpha, beta₁ and beta₂-globulins. Endogenous erythropoietin tested by intradermoreaction reaches peak values at 4—6 hours after exposing rabbits to a simulated altitude of 5500 m. The investigations concerning the immunogenic quality of erythropoietin point to the possible utilization of the antierythropoietin test, by the cutaneous anaphylactic reaction.

Based on immunological characteristics of erythropoietin other testing procedures were suggested such as immunoprecipitation, inhibition of the immunohemagglutination or the very sensitive immunoassay test.

ERYTHROPOIETIN EXTRACTION

Baciu, Rosenfeld, Dorofteiu, Rusu (1959) extracted erythropoietin from rabbits, anemized with phenylhydrazine injected i.m. 0,5 ml in 2,5% solution on the first two days and 1 ml on the following three days. The purification of the substance was performed in four stages.

Firstly the serum was fractionated with methanol. The second fraction, containing the alpha₁-alpha₂ and beta₁-globulins, was dissolved and made up to the initial volume.

In order to obtain the pseudoglobulins of the second fraction, the euglobulins were eliminated by precipitation, after dialysis or with readjustment of the pH of the solution with 1% acetic acid, at 5,2 (fig. 18).

Purification of erythropoietin (Baciu, Secăreanu, Vasile, Popa 1964) was done by chromatographing the pseudoglobulins of the second fraction upon DEAE-cellulose column equilibrated at pH 4.6 and by eluting the proteins with 0.01—0.12 M acetate buffer pH 4.6; 4.2 and 3.6 (fig. 19 a).

The active fraction eluted from the DEAE-cellulose column with 0.01 M acetate buffer pH 3.6, was rechromatographed upon a DEAE Sephadex A 50 (Medium) column, equilibrated with acetate buffer at pH 4.6 and elution was performed again at pH 3.6 with acetate buffer of an ascending molarity 0.01; 0.02 and 0.03.

The biological activity of erythropoietin was tested „in vitro“ upon bone marrow cultures (fig. 19 b) and „in vivo“ upon polycythemic mice with ⁵⁹Fe. The fraction, which was purified 750—2300 times is homogenous on paper electrophoresis.

Purifications of 8000 X were also obtained in the zones of maximal concentration of the eluate. By this technique 40—60% of the total biological

activity is recovered. A 35.000 x purification was obtained after filtration on Sephadex column.

The extraction of sheep E from great amounts of serum (Baciu, Vasile, Pavel, Toader and Băiescu, unpublished data) is made by 1:4 dilution of the serum with distilled water. Zn acetate is added to the concentration of 0.08 M. The mixture is stirred for 30 min, the precipitate being removed. To the containing supernatant DEAE-cellulose equilibrated to pH 6.8 is added. The mixture is stirred for 3 hours, allowed to sediment the cellulose which is washed abundantly with the same buffer pH 6.8, 0.05 M. Elution is made by increasing the molarity of the buffer to 0.2 M. From the elution fluid, erythropoietin is recovered by precipitation in a ratio of 90%, 1 mg protein containing 3 U E.

From the human urine, preserved with phenol at -5°C the precipitated salts are removed. The pH is then corrected to 6.8 by adding zinc acetate to the concentration 0.08 M. The precipitate is removed. Benzoic acid (40% alcoholic solutions) is added to the supernatant. The mixture is stirred for 30 min then is allowed to sediment. The precipitate is retained by centrifugation and solved in Tris alcohol. By reprecipitation with absolute alcohol the proteins precipitate and the benzoic acid is removed. The erythropoietin reprecipitate. The output of this technique is 90%, 1 mg protein containing 12 U erythropoietin.

PHYSIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS

At the relatively low purity degree, subsequent investigations (Baciu et al.) were directed not only towards the physicochemical characterization, but more towards the study of the formation site, biogenesis, mechanism of action and biological effects of E. As a physico-chemical property we mention the assessment of the molecular weight of sheep serum E by gel filtration on Sephadex 150 column, obtaining a ray of the molecule of 32—32,7 Å, which corresponds to a weight of 58—60.000 (V. Vasile, 1971).

SITE OF PRODUCTION OF THE ERYTHROPOIETIN

Data concerning the site of erythropoietin formation are still controversial. According to the present data, an important organ in the production of erythropoietin would be the kidney. Jacobson et al. (1957) have shown that, following bilateral nephrectomy, the erythropoietin secretion is stopped in rats exposed to hypoxia, or treated with Cl_2Co . Three years later, in experiments carried out on dogs, Naets (1960) described the same phenomenon. Kuratowska et al. (1960, 1964) by perfusing rabbit isolated kidney with hypoxic blood, obtained and increase of the erythropoietin activity in the perfused fluid, and Takaku et al. (1962) have shown that unilateral renal ischemia of rats produces an augmentation of plasma erythropoietin. This increase is absent in post-hemorrhage conditions, after sectioning the splanchnic nerves.

In contradiction with these findings, other researchers found different experimental data, Erslev et al. (1958) after total nephrectomy, followed by hemorrhage in rabbits, has found an increase in the plasma erythropoietic activity and Mirand and Prentice (1958), in investigations made in man and on anephric animals, established the persistence of erythropoietin production. The same conclusions were drawn by other authors (Nathan et al. 1964). Baciu, Oprișiu, Dorofteiu and Rusu (1963) performed

experimental studies in rats and dogs to evaluate the role of kidney in elaborating the erythropoietin in hypoxic conditions. The erythropoietin is secreted in the blood of recently nephrectomized rats, 24 hours previously held to an altitude of 5000 m. The alpha-pseudoglobulins, of control and nephrectomized animals, submitted to hypoxia containing the isolated erythropoietin by p.p., free of the seric retention compounds with toxic characters, tested biologically in rats, determine similar effects upon their reticulocytes and erythrocytes (fig. 24).

Other experiments of the same authors were performed on dogs with chronically „isolated head“ (fig. 25 a); kidney autotransplant was performed on a carotid artery and the corresponding jugular vein. The other kidney was removed. In the animals prepared in this way, renal ischemic hypoxia produced by pneumatic compression of the carotido-renal anastomosis, 8 hours daily, for three consecutive days, is not followed by an increase of serum erythropoietin and the characteristic erythrocytic response, reticulocytosis and polyglobulina (fig. 25 b). However, this occurs with regularity following cephalic ischemic hypoxia, obtained by compressing the opposite carotid artery (fig. 50).

It can be concluded from these results that the sensors for hypoxia, playing a role in erythropoietin biogenesis, are not located in the kidney, but in the region of the head.

Subsequent investigations by Gordon et al. (1968) showed that the kidney participates in erythropoietin biogenesis by the production of an enzyme — REF — with an esterase and protease-like activity — which is released into the blood flow in conditions of hypoxia and which releases the active erythropoietic factor by acting upon a plasma profactor (ESF).

In other experiments on rabbits, with obvious anemic hypoxia caused by bleeding, erythropoietin appeared in the lymph drained from the thoracic duct in the first four hours after hemorrhage. In similar investigations on dogs with hypoxic hypoxia (inhalation of a mixture of gases with 10% O₂ for eight hours) the significant erythrocytic reaction was found to occur no more when lymph was drained outside the organism (fig. 26 and 27).

It appears that renal ischemic hypoxia does not activate erythropoietin production and that extrarenal mechanisms may interfere with erythropoietin formation. RES plays some role in the production of erythropoietinogen. Total drainage of the lymph during hypoxia arrested the appearance of erythropoietin in the circulation.

In order to estimate the role played by RES in the production of erythropoietin (Baciu, Dorofteiu et al. 1970) India ink was injected in a dose of 32 mg/100 g body weight into rats. Disturbance of the activity of RES cells leads to marked depression of the erythrocytic reaction (fig. 28).

In experimental researches (Baciu, Dorofteiu, Olteanu et al. 1973), aimed to assess the role of the protease system in the biogenesis of erythropoietin, rats were subjected to various types of hypoxia. Prior to hypoxia, the animals were injected with enzymatic inhibitors: epsilon-aminocaproic acid Fluka (EACA) and an inhibitor of the proteases extracted from the parotid, Trasylol-Bayer. Assay of E in the plasma of such rats was subsequently performed by means of ⁵⁹Fe incorporation into polycythemic posthypoxic mice (fig. 29). Estimation of E as assessed by changes in erythrocyte and reticulocyte count in normocytic mice was also carried on (fig. 30).

Erythropoietin production in rats exposed for five hours to 0.4 atm. is blocked by EACA ($p < 0.01$) and Trasylol ($p < 0.01$), (as compared to the control group). In the animals, exposed for three consecutive days five hours each

day to 0.4 atm, it was found that the immediate reflex responses to hypoxia was present, but erythropoietin production was absent.

After a hemorrhage, representing 3 per cent of the body weight, administration of EACA and Trasylol during the first three days inhibits the process of E formation and the medullary erythropoietic reaction. Plasma harvested from nephrectomized and anemiated rats, incubated „in vitro“ with cholinesterase, hyaluronidase, kalikrein or renal erythropoietic factor (REF) gains erythrostimulating properties (fig. 31). In the same way proteins in the plasma of rats, injected previously with EACA and exposed to 0.4 atm, for five hours, isolated by precipitation and incubated in vitro with hyaluronidase (inactivated then with heparin) or cholinesterase (inactivated by heating) gain the property of stimulating erythropoiesis.

These data suggest that hypoxia leads to the activation of certain esterases or proteases (Baciu, Dorofteiu, 1973). In order to test this hypothesis plasma esterase and protease activity was measured by Baciu and Ivanof (1975) in rats exposed to a simulated altitude of 5500 m in a hypobaric chamber. Blood samples were taken at 4, 12, 24, 48 and 72 hours intervals, for the determination of serum aliesterase and cholinesterase activity and of neuraminic acid concentration.

The results demonstrate a decrease in esterase activity by 33—35% during the first 4—12 hours, followed between 12 and 24 hours by an increase of 19 and 65% for aliesterase and cholinesterase respectively (fig. 32). In conclusion, no causal correlation can be established between the rise in serum erythropoietin — which is obtained in the first 4—8 hours of hypoxia — and the studied esterase activity of the serum.

BIOGENESIS OF ERYTHROPOIETIN

The impossibility to extract important amounts of erythropoietin from hypoxic kidneys led Kuratowska et al. (1964) to suggest that erythropoietin is not released by the hypoxic kidney in a biologically active form, but as a precursor or activator.

It was thus that the renal precursor of the erythropoietic active factor (REF) is an enzyme (erythro-genin) found in the light mitochondrial fraction (Contrera et al. 1966; Gordon et al. 1968), which interacts with a serum factor (erythropoietinogen) to form the active erythropoietin. According to Peschle and Condorelli (1975) the liver would also participate in the biogenesis of erythropoietin, its formation being a more complex process.

The constant release of certain enzymes of lysosomal origin in emergency reaction is well known. One might therefore suspect that also the erythropoietic profactor increases during the hypoxic stress is a lysosomal enzyme (Baciu, Ivanof, Pavel, Mureşan, Benga, 1978). A first experimental confirmation of the supposition about the lysosomal origin of an erythropoietic factor was obtained in researches made in rats, which, before exposure to hypoxia of 0.5 atm, 4 hours in a hypobaric chamber, were treated with lysosomal membrane labilizing and stabilizing agents. For this purpose, Vitamin A was used as a labilizing agent in a daily dose of 20.000 UI/kg body weight; as stabilizer, cortisol hemisuccinate was used in a dose of 5 mg/100 g body weight daily for seven days. The results show a significant labilization of the lysosomal membranes. After stabilization of the lysosomal membranes the serum erythropoietic activity shows a smaller increase than in the animals treated with labilizing agents.

In other experiments the serum level of certain lysosomal enzymes was investigated in rats submitted by hypobaric hypoxia (0.5 atm for 4—12 h) simultaneously with the behaviour of erythropoietin tested by incorporation of ^{59}Fe and by ribose absorption in the bone marrow cells. Under the effect of hypoxia a progressive increase of acid phosphatase and of N-acetylglucosaminidase was observed. The activity of beta-glucuronidase shows two peaks, which precede those of serum erythropoietin (fig. 34).

The above mentioned enzymes should be considered only as markers of lysosomal labilization and their possible role as erythropoietic profactor of renal origin cannot be ascertained. Their rise in the serum during hypoxia, in connection with that of erythropoietin, could be an additional argument for a lysosomal involvement.

The last mentioned researches were made on renal lysosomes isolated according to Shibko et al. (1965) taken from rats kept in hypoxia between 90 minutes and 12 hours and which then were incubated „in vitro“ for 30 min at 37°C with normal serum.

The erythropoietic activity of the incubated product was tested by the incorporation of ^{59}Fe in polycythemic hypertransfused mice and compared with serum activity (fig. 35).

The increase in the incorporation of ^{59}Fe in the red blood cells, with identical dynamics in the incubated material and in the serum, from hypoxic animals containing E therefore, demonstrated the presence in the renal lysosomes of an erythropoietin-forming factor. Similar data were reported during the last time by Libbin (1974). A possibility which requires direct experimental checking, is that the lysosomes of other organs, too, may release certain erythropoietin forming enzymes.

TESTING THE BONE MARROW WITH ERYTHROPOIETIN

In order to establish whether the erythrocytary response to exogenous erythropoietin could become a useful test for exploring hematopoiesis, the above mentioned response was investigated in mice with irradiation-induced reduction of the stem cells (Baciu, Pavel, Vasile, Vitebski, 1970).

The mice were treated with erythropoietin and then irradiated with various x-ray doses: 250, 500, 750 and 1000 r. administered in 5 successive applications at two days intervals. The erythropoietic response to erythropoietin was estimated by peripheral reticulocytosis and by the speed of radioactive iron incorporation into the erythrocytes, simultaneously checking up the peripheral blood (hemoglobin, hematocrit, erythrocytes). The results have shown that the response to erythropoietin can constitute a functional test for the ability of the stem cells to regenerate (fig. 44 a and b).

In order to study the way of action of E (Baciu, Pavel, Prodan, Deac, 1974) its effect upon the radiosensitivity was followed up in mice irradiated with 650 r, for 6, 8, 12, 16, 18 hour, following the administration of the hormone in a dose of 1.2 U/animal. The concentration of the purine and pyrimidine bases in the bone marrow and the mytotic activity in the medullary red cells were followed up after the same time interval, following 6.0 U/animal (rat).

Erythropoietin administered before the irradiation caused phasic changes in the radiosensitiveness of the animals depending on the duration of the time interval elapsed from the moment of erythropoietin administration till

that of irradiation. The maximal radioprotecting effect was obtained 12 and 24 hours following hormone administration (fig. 36). Six hours after the administration the survival of the animals decreases in a significant measure as compared with the controls (fig. 39). Erythropoietin stimulated the DNA and RNA synthesis with maximal levels at 4 and 6 hours after its administration; the synthesis coincides with the activity of the cell division (mitotic index and the number of medullary metaphases) (tab. V).

The lowered lethality during the first 10 days in the animals in which erythropoietin was administered 12 hours before the irradiation argues, in favour of the action of erythropoietin on the hemopoietic stem cells which are also generating granulocytes. The radioprotecting effect during the first hours after erythropoietin administration follows a mechanism depending upon the mitotic phases, different from that seen during the onset of polyglobulia which is also the consequence of the increase in the number of stem cells in the bone marrow.

EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN ON RIBOSE ABSORPTION IN THE RED CELLS

Starting from the finding that erythropoietin induces RNA synthesis, the question arose whether the bone marrow cells do not absorb from the „in vitro“ nutritive medium, a greater amount of ribose, (Baciu, Ivanof, Mureşan and Pavel (1977). This ribose uptake could be developed into biochemical method for the quantitative determination of E. The investigations were carried out on mouse bone marrow incubated in a nutritive medium with ribose added. The marrow was obtained 4 or 5 hours after the animals were injected intraperitoneally with erythropoietin or with hypoxic rat serum.

The concentration of serum erythropoietin, obtained by exposure of the rats for various periods (4, 8, 12 and 24 hours) to hypobaric hypoxia of 0.5 atm, was tested at the same time by the method of ^{59}Fe incorporation in polycythemic mice.

The results demonstrate that erythropoietin increases ribose uptake into the medullary cells, proportionally with the dose given to the marrow donor animal (fig. 40). The method allows the determination of amounts down to 0.2 U erythropoietin, showing a good reproducibility and requiring a rather short time.

If ribose uptake is assayed under the action of erythropoietin on a wholly „in vitro“ system, the sensitivity and reproductibility of the technique is greater (Baciu and Ivanof, 1980). A suspension of normal erythrocytes (2:1) is prepared in saline buffered with sodium phosphate at pH 7.4. To 200 ml samples of this suspension 25–50 μl serum, plasma or other purified material to be tested is added. After a preincubation for 10 minutes at 37°C 1000 μl isotonic medium containing 0.66 mM ribose is added and incubation is continued for other 60 minutes with slow rotation of the tubes. The amount of ribose absorbed by erythrocytes being proportional with the amount of erythropoietin from the tested material, the values of the ribose consumption can be converted in erythropoietin units by means of a standard curve, carried out with standard erythropoietin (fig. 41).

The amplitude of the response was found to be negatively influenced by the hematocrit of the erythrocyte suspension. Therefore by decreasing the values of the hematocrit to 2 and 3% a sensitivity of 0.02 U erythropoietin per sample could be obtained.

BONE MARROW BLOOD FLOW

Erythropoietin activates the blood flow in the bone marrow (Baciu, Derevenco, Pavel, 1974).

Influence of endogenous erythropoietin liberated in conditions of hypoxia and of exogenous erythropoietin (6 U/animal injected subcutaneously) upon the relative blood flow in bone marrow was examined in rats using the method of Rubidium-86 distribution according to Sapirstein. No changes of blood in bone marrow were noted after 4 and 8 hours of hypobaric hypoxia (0.5 atm). After 12 h a significant increase (60%) of the blood flow was observed, the normalisation occurring after 24 h (tab. X).

Injections of exogenous erythropoietin produce an enhancement of blood circulation in the bone marrow (70% and 110% respectively). After 24 h no changes could be noted. Inactive pseudoglobulins did not produce changes of blood flow in the bone marrow.

The effects of endogenous and exogenous erythropoietin upon bone marrow circulation should be explained especially by the proliferation of bone marrow cells induced by this hormone.

NERVOUS REGULATION OF THE ERYTHROPOIESIS

Data concerning the nervous regulation of erythropoiesis are rather controversial. A diminished erythrocytic response to hypoxia was however demonstrated (Baciu et al. 1957) when the peripheral encephalic centres of the rats were isolated by sectioning the spinal cord in the cervical zone. In opposition to control animals who develop within 3—4 days a significant reticulocytosis and polyglobulia when kept in a baric chamber at a simulated altitude of 5000 m, the spinal rats, do not react during this interval, but only after 7—9 days and display a much more reduced activation of erythropoiesis (fig. 45 a, b, c).

A delayed and diminished erythropoietin production and erythrocytic reaction were also emphasized in newborn puppies with undeveloped nervous system (Baciu et al. 1971). In fact the response of such immature animals to hypoxic hypoxia in a hypobaric chamber (simulated altitude of 5500 m) was similar to that occurring in the spinal rat.

The mechanism of the nervous regulation was studied on dogs with chronic isolation of the somato-cephalic circulation (Baciu, Dorofteiu, Rosenfeld, Tomuş, 1960) using an older modified technique (Benetato, Oprişiu, Baciu, 1947) (fig. 46). An advanced degree of hypoxia (6—8% O₂) or a cephalic arterial hypoxia, obtained in the isolated head preparation in which the cerebral flow output is reduced by 40—60 percent, and the nervous tissue O₂ partial tension is maintained in the vicinity of the critical level (a value of 10 mm Hg) (fig. 50) is very required in order to obtain the erythrostimulating effect. Cephalic ischemic hypoxia obtained by the partial compression of the common carotid arteries, tunneled in skin loops (8 hours daily for three consecutive days) produces an erythrocytic response, with a progressive rise in the reticulocyte count, beginning with the second day (fig. 51). Following denervation of the carotid sinuses, the erythrocytic response to cephalic hypoxia occurred after a lapse of time of three days but it was enhanced and associated with a more marked and lasting increase in plasma erythropoietin (fig. 52).

It might be therefore suggested that hypoxia acts upon both chemoreceptive reflex zones and directly, upon some neuron groups in the nervous centers. By the stimulation of the chemoreceptive zones, a number of

immediate reflexes are started such as adjustment to hypoxia: hypertension, acceleration of the pulse rate, polypnea, yawning reflex, intensification of the release of erythrocytes and reticulocytes from the marrow. It clearly appears that erythropoietin secretion is not started by the excitation of the chemoreceptors. On the contrary, our data showed that in the absence of a rapid reflex adjustment subsequent to sino-carotid denervation, the same hypobaric hypoxia determines a more active and more prolonged erythropoietin secretion and a more marked reticulocytosis and polyglobulia.

In agreement with our findings in 1960 (Baciu et al.), Nečas and Thorling (1972) postulated the existence of some different receptors for the release of erythropoietin. These investigators repeatedly injected cyanide intravenously to rats and rabbits exposed to hypoxia and demonstrated that although a block of the sensitiveness of the sino-carotid and aortic chemoreceptors is thus produced, the erythropoietin secretion is not influenced in any way. In the same way Paulo and Fink, Roh and Fisher (1973) like Baciu et al. (1960) showed the persistence of the erythrocytic response to hypoxia, following the sino-carotid denervation.

It seems there are at least two nervous centres involved in the response to hypoxia. A first group of neurons is connected to the neuro-reflex mechanism with its starting point in the sino-carotid chemoreceptive zone, triggering the immediate great reflexes of respiration, and circulation. A second center is probably controlling the neuro-humoral mechanism leading to erythropoietin secretion, whose effects upon blood composition are more delayed. Such a point of view is supported by the observations that in the chronically isolated head the neuro-humoral response persists after sino-carotid denervation (Baciu et al. 1960).

Symmetrical electrocoagulations in the anterior and posterior hypothalamus, the mesencephalic reticular formation and the bulbar reticular formation were performed in rats using stereotaxic methods with bipolar electrodes (Baciu et al. 1964, 1965 and 1968) (fig. 53). The animals were subsequently submitted to hypoxia for at least 72 hours and the erythrocytic response was assessed on the 4th and 5th day. Injuries in the mesencephalic reticular formation did not influence the erythrocytic reaction (fig. 56). Destruction of the anterior hypothalamus (fig. 54) reduces the reticulocyte response to a smaller extent and prevents the erythrocytic response. Bilateral lesions of the posterior hypothalamus in the periventricular grisea substance and the mammillary and supramammillary regions, at the same time with other severe disturbances, block the response to hypoxia (fig. 55). An inhibiting effect is noted also after lesions of medullary reticular formation (fig. 57).

EFFECTORY PATHWAY

In spite of the intensification of respiration and circulation during the response to hypoxia, there is still controversy concerning the behaviour of plasma and urinary catecholamines in both humans and experimental animals submitted to simulated altitudes (cit. by Baciu et al. 1969).

When dogs were submitted to a simulated altitude of 5600 m the excretion of p-hydroxymandelic acid after four hours of hypoxia became twice higher than the basal excretion. (Baciu, Derevenco, et al. 1969). VMA showed very slight changes or remained unchanged. After the first two hours at 7000 m, the VMA excretion increase 3 to 5 times, with an increase of the same order in the HMA. Prolongation of the exposure to 8—12 hours does not increase the excreted amount of catecholamine metabolites. Normalization takes place four hours after the return to normoxia (fig. 59).

From these data it is difficult to establish the pattern of catecholamines secretion. It seems however that the increased excretion of the main adrenalin and noradrenalin metabolites during the first hours of exposure to hypoxia is proportional with the intensity of the solicitation.

A role of the sympatho-adrenal system is also suggested by the reduction of the erythrocytic response to hypoxia in adrenalectomized rats (fig. 60) and in rats treated with adrenergic beta-blocking agents.

It is therefore very likely that hypoxia-induced polyglobulia is triggered by the sympatho-adrenal system through the beta-receptors. After our investigations published in 1973, Fink and Fisher, 1974, reported their results in which animals given beta-blocking agents and exposed to hypoxia produced a lesser erythropoietin than the control animals (fig. 62).

Under the action of the sino-carotid chemoceptive stimulation, a number of immediate reflex reactions are triggered (circulatory, respiratory reflexes, spleno-contraction and release of reticulocytes from the bone marrow).

Erythropoietin release takes place through the direct central nervous action of the hypoxic stimulus, on the pathway of the medullary efferences and of the beta adrenergic sympathetic nerves. After a lapse of time of 3—5 day during which the stem cell is transformed under the influence of the erythropoietic hormone, into proerythroblast and then into more and more mature elements of the red series, reticulocytosis, peripheral polyglobulia of about 7.5 mil/mm^3 and a rise in hemoglobin from $15 \text{ g}\%$ to $24 \text{ g}\%$ appear, increasing by 60% the capacity of the blood to transport O_2 .

The centres of the two central nervous regulations (neuro-reflex and neuro-humoral) are localized in the posterior hypothalamus and in the bulbar reticular formation.

A purely humoral mechanism also includes erythropoietin formation by an enzymatic pathway, but does not preclude the participation of the enzymatic pathways in the absence of the nervous system, under the influence of advanced hypoxia which acts directly upon certain cells, releasing erythropoietin-forming enzymes.

However, it should be revealed that advanced hypoxic hypoxia ($0.4\text{--}0.5 \text{ atm}$) determines, after a longer period of latency, a more reduced erythrocytic response also in rats with sectioned spinal cord. This could be accounted for by a mechanism in which hypoxia acts directly on the cells, playing a role in erythropoietin release, without the intervention of a nervous mechanism. In experimental investigations with perfusions of isolated lung-kidney in dogs, Erslev et al. demonstrated in 1965 this possibility, in the conditions of advanced hypoxia, producing cell necrosis. Other cellular mechanisms involved in the adjustment to hypoxia are represented by a rise in erythrocyte diphosphoglycerate leading to an improvement of their hemoglobin O_2 exchange capacity, an increase in muscle myoglobin and a decrease in mitochondrial cytochromoxydase. An increase and a proliferation of the capillaries in some organs was also reported.

A model of the regulation of erythropoiesis is proposed based on exposed data (fig. 64).

A MATHEMATICAL MODEL OF THE HOMEOSTATIC SYSTEM OF THE OXYGEN

The fundamental parameters of this system are tissue P_{O_2} , P_{CO_2} and the interstitial and cellular pH. The regulation of these to constant (normal) levels is achieved within this model by effector parameters. Of these parameters the respiratory output, the alveolar exchange, the cardiac output,

blood pressure, capillary blood flow, capillary permeability, total erythrocyte volume, the buffer capacity and the elimination of CO_2 and generally of H^+ ions were taken into consideration. The action of the effector parameters upon the fundamental ones is exerted either directly or indirectly by means of the intermediate parameters: arterial PO_2 and PCO_2 , pH of the blood. The disturbing factors taken into consideration are: the variation of tissue O_2 consumption, respectively concentration in the atmospheric air, of the humoral and cellular pH, of the atmospheric pressure and of temperature (fig. 67). The construction of the model is based on an interpretation of the system as being formed of two multi-compartment open systems connected between them by functional relationships (Baciu, Aramă, 1974, 1977, 1978). The first subsystem represents the respiratory and circulatory functions conceived in a unitary functional framework in the structure of which 10 main compartments were distinguished. Between these O_2 , CO_2 and H^+ exchanges take place (fig. 68).

The second subsystem is constituted by the erythron. This is interpreted as a two-compartment dynamical system the functional compartment representing the circulating erythrocytes. These are under the action of three continual fluxes representing the release of erythrocytes from deposits into the blood, the formation and release of some new erythrocytes generated into the bone marrow under the action of erythropoietin and hemolysis (fig. 69). The integrative cybernetic schemes of the oxygen homeostasis subsystems and the equation of the O_2 , CO_2 and H^+ continuity in each compartment of subsystem 1, as well as the equations of the erythrocyte continuity in the compartments of subsystem 2 were established. The analytical expressions of the fluxes acting upon the various compartments of the two subsystems depending on the levels of the effector parameters, and then, the equations of the devices regulating these were established.

Redactor: FELICIA TEODOR
Tehnoredactor: HLAVATHY L.

Apărut: 1980. Bun de tipar: 11.12.1980. Comanda nr.: 2000.
Coli de tipar: 15,5. Hirtia: velină 63 g/mp. Format: 61×86/16.

Tiparul executat sub comanda nr. 546
la Întreprinderea Poligrafică Cluj, Municipiul Cluj-Napoca
B-dul Lenin nr. 146.
Republica Socialistă România

